

171

576.8(04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Posición Taxonómica, Clasificación, Aislamiento e Identificación de los Cocos Gram Positivos Patógenos para el Hombre

María del Carmen Pérez Castro



QUIMICA

MEXICO, D. F.

1951



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

UNIVERSIDAD MOTOLINIA

Posición Taxonómica, Clasificación, Aislamiento e Identificación de los Cocos Gram Positivos Patógenos para el Hombre

Tesis que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
Presenta

María del Carmen Pérez Castro



QUIMICA

TIPOGRAFICA ORTEGA
Emperadores 114
México, D. F. — 1951

A MIS PADRES Y HERMANOS,
a quienes todo les debo,
con cariño y gratitud.

A MIS TIAS,
con todo cariño.

AL Dr. DIEGO B. GONZALEZ TERAN.

Mi agradecimiento por su acertada dirección en este trabajo.

Al Laboratorio Médico de Frontera No. 22 por las facilidades proporcionadas para la realización de este trabajo.

A MI HONORABLE JURADO:

Prof. RAFAEL ILLESCAS FRISBIE.

Prof. RICARDO CATUREGLI.

Prof. OSCAR AMOR D.

Dr. FRANCISCO BARRIOS.

Prof. IGNACIO DIEZ DE URDANIVIA.

POSICION TAXONOMICA, CLASIFICACION, AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS COCOS GRAM POSITIVOS PATOGENOS PARA EL HOMBRE

INTRODUCCION

La bacteriología clínica tiene como propósitos generales:

1o.—Investigación en productos biológicos, la presencia de gérmenes patógenos o potencialmente patógenos.

2o.—Identificación de estos gérmenes, de ser posible hasta determinar la especie.

3o.—Determinación de la patogenicidad de los gérmenes aislados.

Estos principios generales tienen que aplicarse al tratar de aislar e identificar los gérmenes motivo de este estudio.

ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

El bacteriólogo que pretenda prestar servicios a la clínica debe tener presente las siguientes dos reglas:

1.—Debe estar preparado para llegar a la identificación del género y muchas veces de la especie de los gérmenes aislados y no sólo hasta la determinación de la familia a que pertenecen. El interés de llevar la identificación del germen hasta la especie si es posible, no reviste un interés teórico solamente, pues es bien sabido que ciertos gérmenes pertenecientes a una misma familia y aún a un mismo género, pueden ser simples saprofitos o bien ser patógenos según la especie a que pertenezcan.

2.—El bacteriólogo debe estar preparado para usar técnicas o métodos con las cuales se puedan aislar del ser humano los diversos gérmenes patógenos o potencialmente patógenos. Esto sólo se puede lograr conociendo las características biológicas de estos gérmenes. Es cosa frecuente que el bacteriólogo tenga que afrontar el problema de practicar hemocultivos, por ejemplo, desconociendo totalmente el diagnóstico clínico del caso, y en tal situación es necesario emplear medios de cultivo adecuados al crecimiento tanto de gérmenes aerobios como anaerobios o simplemente microaerofilos.

Concretándonos al tema de esta tesis, creemos que el problema de aislar e identificar a los cocos Gram positivos parásitos del hombre, es un trabajo frecuentemente laborioso, pues el estudio de este grupo de gérmenes se ha hecho, por los numerosísimos investigadores que los han estudiado, en forma aislada, pero sin que se haya publicado hasta la fecha monografía alguna, que los estudie y los describa en conjunto.



OBJETO DEL TRABAJO

Son pues los propósitos de esta tesis:

I.—Fijar la posición taxonómica de los cocos parásitos del hombre, siguiendo el manual de bacteriología de Bergey (1), pues es este el texto más ampliamente difundido en la actualidad y en donde se ha hecho la recopilación de los trabajos más recientes que clasifican a los gérmenes motivo de este trabajo.

II.—Señalar métodos y técnicas modernas que permiten el aislamiento, clasificación y determinación de la patogenicidad de los gérmenes aislados, por medio de una revisión de la bibliografía de los últimos 10 años.

III.—Señalar qué procedimientos serológicos existen para determinar en el organismo humano la existencia de anticuerpos, que indiquen una infección presente o pasada por cocos Gram positivos.

POSICION TAXONOMICA DE LOS COCOS GRAM POSITIVOS

Los siguientes cuadros sinópticos fueron estudiados, como se dijo antes, directamente del Manual de Bacteriología de Bergey. En ellos están comprendidos todos los grupos de gérmenes que nos interesan, no solo por contener las especies patógenas sino también las simples saprofitas y aquellos otros grupos que aunque tienen características morfológicas y biológicas diferentes de los cocos Gram posi-

tivos, nos ayudan a hacer más comprensible la situación de estos cocos Gram positivos dentro de la clasificación.

Se subrayan en los siguientes cuadros, los grupos de gérmenes y las características que son de mayor interés. En el cuadro que sigue a continuación se da el Orden y las Clases a que pertenecen los gérmenes.

1°—Todos los cocos gram positivos pertenecen a la clase *Schizomycets Nageli*.

2°—La clase *Schizomycets* se divide en los siguientes órdenes:

Orden I.—*Eubacteriales Buchanan*.

Orden II.—*Actinomyceetales Buchanan*.

Orden III.—*Chlamydobacteriales Buchanan*.

Orden IV.—*Myxobacteriales Jahn*.

Orden V.—*Spirochaetales Buchanan*.

3°—Todos los gérmenes que nos interesan pertenecen al orden I *Eubacteriales Buchanan*.

4°—Todos los gérmenes que nos interesan pertenecen al suborden I *Eubacteriineze*.

5°—Todos los gérmenes que nos interesan pertenecen a las familias V y VII *Micrococcaceae* y *Lactobacteriaceae* respectivamente.

Clase Schizomycets Nageli

Son típicamente plantas unicelulares. Son células usualmente pequeñas y algunas veces ultramicroscópicas frecuentemente móviles. Las células crecen de un núcleo claramente organizado tal como se encuentra en las células de las plantas superiores o en los animales. Sin embargo hay células que contienen cromatina la cual representa un núcleo simple y que puede demostrarse en algunos casos. Las células individualmente pueden ser esféricas, o en forma de bastón recto, curvo o en espiral. Estas células pueden presentarse en forma de masas regulares o irregulares. Cuando las células permanecen unidas unas a otras después de la división celular, pueden formar cadenas o aún verdaderos filamentos. Estos últimos pueden mostrar una verdadera

diferenciación en forma de conidios. Algunas células crecen como micelios ramificados cuyo diámetro no es mayor que el de una célula bacteriana ordinaria. Algunas especies producen pigmento el cual puede tener propiedades de fotosíntesis. La multiplicación celular se presenta en forma típica por división de la célula. Algunas especies forman endosporas y otras esporocystos. En algunas especies hay órganos ultramicroscópicos de reproducción. Las bacterias tienen vida libre o bien son saprofiticas o parásitos o bien patógenas. Estas últimas producen enfermedad en plantas o en animales.

Clave para identificación del orden Eubacteriales y del Suborden Eubacterineae. De la clase Schizomycetes.

A.—Células rígidas no flexuosas. Movilidad por medio de flagelos o por movimientos de deslizamiento.

1.—Células aisladas, en cadena o en masas. Sin ramificaciones y sin aspecto de micelios. No agrupadas en filamentos. No son ácido resistentes. Cuando son móviles lo son por medio de flagelos.

Orden I Eubacteriales.

a.—No tienen pigmentos para fotosíntesis. Las células no contienen azufre.

b.—No están fijadas por una base. No forman hidróxido férrico.

Sub-Orden I Eubacterineae

bb.—Fijos al substrato habitualmente por un tallo, algunas especies forman hidróxido férrico.

Sub-Orden II Caulobacterineae.

aa.—Poseen un pigmento semejante a la clorofila el cual tiene propiedades fotosintéticas. Algunas células contienen azufre libre.

Sub-Orden III Rhodobacteriineae.

2.—Organismos alargados usualmente con ramificaciones y células del tipo de los micelios. Se multiplican por división celular o bien por esporas, oidiosporas o conidios. Algunos son ácido resistentes.

Orden II Actinomycetales.

3.—Células en forma de filamentos frecuentemente encerrados en una vaina tubular forman o no hidróxido férrico, algunas células pueden estar unidas unas a otras. Pueden tener flagelos móviles y conidios inmóviles. Hay filamentos móviles con movimientos de deslizamiento. Algunas veces las células contienen azufre libre.

Orden III Chlamydobacteriales.

B.—Células flexuosas no rígidas.

Orden IV Myxobacteriales.

Orden V Spirochaetales.

Orden I Eubacteriales Buchanan.

Células sencillas e indiferenciadas, rígidas, las células son o esféricas o en forma de bastón.

Los bastones pueden ser cortos o largos, rectos o curvos o bien en espiral. Algunos grupos o especiales son inmóviles, otros son móviles por medio de flagelos. Las células alargadas se dividen por función transversa y pueden permanecer unidas unas a otras en cadenas. Las células esféricas se dividen ya sea por fición paralela produciendo cadenas, o bien por fición alternante en dos o tres planos, produciendo así tetradas o bien cubos de ocho células o múltiplos de ocho.

Muchas células esféricas forman masas irregulares en las cuales el plano de división no puede ser definido. En algunas especies forman endosporas. Algunas especies son cromogénicas, pero sólo en muy pocas de ellas el pigmento es capaz de producir fotosíntesis. (Este pigmento es la clorofila bacteriana u otro pigmento semejante a la clorofila).

Sub-Ordenes del Orden I

Sub-Orden I Eubacterineae.

Breed, Murray y Hitchens.

Estas son como el nombre lo indica, las verdaderas bacterias en el sentido estricto de la palabra; las células son rígidas y libres. Las células presentan ramificaciones sólo en condiciones anormales de vida. Las células no están sujetas ni por sostenes ni por tallos al medio en que crecen. No forman vainas. Una tercera parte de las especies forma pigmentos pero ninguna de éstas tiene propiedades de fotosíntesis. Hay endosporas en una familia (Basillaceae) en este suborden, pero muy rara vez, encuentran endosporas en las especies pertenecientes a otras familias.

Sub-Orden II Caulobacterineae.

Breed, Murray y Hitchens.

Son bacterias no filamentosas que crecen unidas unas a otras característicamente sobre especie de tallos algunas veces seciles. Las células que forman el tallo son asimétricas y secretan hidróxido férrico u otra materia en un extremo de ellas para formar el tallo. Se multiplican por fición transversa, en algunas especies los tallos o son muy cortos o no existen. En este último caso las células pueden estar unidas directamente al substrato en una masa zooglear. Las células pueden presentarse aisladas, en pares o en cadenas cortas pero nunca en filamentos. No tienen vainas, no forman esporas, típicamente son habitantes acuáticas.

Sub-Orden III Rhodobacterineae.

Células esféricas, en bastón, vivrios o en forma de espiral. El tamaño de las células individuales varía desde un micrón o menos hasta veinte micrones. Cuando son móviles se debe a la presencia de un flagelo polar son Gram Negativo no forman endosporas. Son bac-

terias rojas, púrpura, café o verdes, las cuales contienen clorofila y usualmente poseen uno o más pigmentos. Son capaces de llevar a cabo metabolismos de fotosíntesis, los cuales difieren del de las plantas verdes en que no proceden de la evolución del oxígeno sino que depende de la presencia de compuesto oxidables los cuales son dehidrogenados con la simultánea reducción de bióxido de carbono. Como substratos oxidables una gran variedad de sustancias simples pueden ser usadas, tales como sulfhídrico u otros compuestos sulfurosos reducidos, hidrógeno molecular, oleoholes y ácidos grasos. Todo este grupo de gérmenes puede crecer en condiciones estrictamente anaerobias en presencia de luz. Aquellos gérmenes de este suborden que pueden crecer en presencia de aire también pueden ser cultivados en la obscuridad pero en condiciones aerobias. El calor depende marcadamente de las condiciones ambientales; los individuos pequeños parecen incoloros a menos de que se observen en masas. Muchos de estos gérmenes contienen glóbulos de azufre. Las especies descritas hasta ahora han sido encontradas principalmente en aguas dulces, algunas especies son habitantes marinos.

Clave a las familias del SubOrden Eubacterineae.

I.—*No forman endosporas* (excepto las *Sporosarcinas*).

A.—Pueden desarrollarse en medios inorgánicos. Son autotrópicos y autotróficos facultativos.

Fam I.—*Nitrobacteriaceae*.

B.—*No pueden desarrollarse en medios inorgánicos* con excepción de algunos miembros de la familia *Bacteriaceae*.

Todos son heterotróficos.

1.—Flagelos polares. Son bastones rectos, curvos o en espiral. Gram negativos.

Fam. II—*Pseudomonaceae*.

2.—Células largas, ovales y pleomorficas de aspecto muchas veces semejante al de las levaduras. Viven libremente en la tierra, fijan nitrógeno. Flagelos peritricos.

Fam. III.—Azotobacteriaceae.

3.—Bastones inmóviles o móviles con flagelos peritricos, o bien cocos.

a.—Bastones heterotrópicos. Los cuales pueden no requerir nitrógeno orgánico para crecer. Usualmente móviles con flagelos de uno a seis y a veces más. Usualmente forman nódulos o tubérculos en las raíces de las plantas o muestran cromogénesis violeta.

Fam. IV.—Rhizobiaceae.

aa.—Bastones o cocos heterotróficos los cuales si utilizan nitrógeno orgánico y usualmente carbohidratos.

b.—Células esféricas en masas o tétradas. Unas cuantas especies son móviles con uno o dos flagelos.

c.—Cocos Gram positivos o Gram negativos. No son parásitos obligados.

Fam. V.—Micrococcaceae.

cc.—Cocos Gram negativos algunas veces anaerobios. Son parásitos obligados.

Fam. VI.—Neisseraceae.

bb.—Células esféricas que crecen en pares o en cadenas. También hay grupos que son bastones.

c.—Cocos y bastones gram positivos no móviles con excepción de algunas especies de Streptococcaceae y Corynebacteriaceae que pueden mostrar movilidad.

d.—Cocos y bastones que van de aerobios a microaerofilicos y anaerobios. Frecuentemente en cadenas. Activos fermentadores de azúcares nunca reducen nitratos.

Fam. VII.—Lactobacteriaceae.

dd.—Bastones usualmente aerobios pero algunas veces anaerobios. Poco activos en la fermentación de azúcares, pueden o no reducir nitratos.

Fam. VIII.—Corynebacteriaceae.

cc.—Bastones Gram negativos. Cuando son móviles tienen cuatro o más flagelos peritricos.

Fam. IX.—Achromobacteriaceae.

Fam. X.—Enterobacteriaceae.

Fam. XI.—Parvobacteriaceae.

Fam. XII.—Bacteriaceae.

II.—Forman esporas. Grandes bastones, algunas veces en cadenas. Aerobios o anaerobios.

Fam. XIII.—Bacillaceae.

En el siguiente cuadro se señalan, subrayando las familias del Sub-Orden Eubacterineae que nos interesan.

Sub-Orden I Eubacterineae.

- Familia I.—Gérmenes no parásitos que habitan la tierra y el agua. Ninguno es esférico con excepción de una especie.
- Familia II.—Contiene especies que son habitantes del agua, las plantas o la tierra o bien son patógenos para los animales incluyendo el hombre, no son esféricos y todos son Gram negativos.
- Familia III.—Son gérmenes que habitan la tierra y el agua, no son parásitos del hombre, aunque hay formas cocoides, todos son Gram negativos.
- Familia IV.—Parásitos de las plantas pero no de los animales. No hay formas cocoides y la mayoría de las especies son Gram negativos.
- Familia V.—*Sí nos interesa.*
- Familia VI.—Células esféricas en pares o en masas, todas las especies conocidas pueden ser parásitos del hombre, pero todos son Gram negativos. No producen indol. No reducen nitratos y son catalasa positivos.

- Familia VII.—Si nos interesa.
- Familia VIII.—Parásitos y patógenos de los animales y las plantas, también se les encuentra en los productos lácteos, la tierra y el agua. Generalmente Gram positivos pero no hay formas cocoides.
- Familia IX.—Gérmenes que habitan aguas saladas, agua dulce y la tierra. Pocas formas son parásitas. Algunas especies son patógenas de las plantas. No hay formas cocoides y generalmente son gérmenes Gram negativos.
- Familia X.—No hay formas cocoides y todos son gérmenes Gram negativos. Pueden ser patógenos del hombre.
- Familia XI.—Son bastones Gram negativos, pueden ser patógenos del hombre y animales.
- Familia XII.—Hay especies Gram positivas pero todas son en forma de bastones.
- Familia XIII.—No hay formas cocoides aunque generalmente son Gram positivas. La mayor parte son saprófitas que comúnmente se encuentran en la tierra. Unas pocas especies son parásitos y patógenos de los animales, especialmente de los insectos.

Fam. V.—*Micrococcaceae*. Pribram.

Células sin endosporas excepto en las Sporosarcinas. Son esféricas al estado libre; durante la división son algo elípticas. La división se presenta en dos o tres planos. Si después de la división las células permanecen en contacto, son frecuentemente aplanadas en el plano de la última división. Se presentan aisladas en pares, en tétradas, en paquetes o en forma de masas irregulares. Muy raras especies son móviles. Generalmente son Gram positivas. Muchas especies forman un hongo que puede ser amarillo, naranja, rosado o rojo. La mayoría de las especies son preferentemente aeróbicas produciendo abundante crecimiento en los medios de cultivo ordinarios, pero son capaces de

crecer en condiciones ligeramente anaerobias. Unas cuantas especies son extracítamente anaerobias. Metabolismo heterotrófico. Los carbohidratos son frecuentemente fermentados con producción de ácido. La gelatina es frecuentemente licuada. Son gérmenes facultativamente parásitos y saprófitos. Frecuentemente se les encuentra viviendo en la piel, en las glándulas de la piel y en las secreciones de las glándulas de la piel de los vertebrados.

Clave a los géneros de la familia Micrococcaceae.

I.—Células que se presentan en placas (láminas), en grupos o en masas irregulares pero nunca cadenas. Cuando contienen pigmento éste es amarillo, naranja o rojo, pueden ser Gram positivos o Gram negativos.

Género I.—*Micrococcus*.

II.—En el cuerpo de los animales y en medios especiales las células se presentan en tétradas. En los medios de cultivo ordinarios las células pueden presentarse en pares o masas irregulares. Color que va del blanco a amarillo pálido.

Género II.—*Goffkya*.

III.—Células que se presentan en paquetes irregulares usualmente forman pigmentos color amarillo o naranja.

Género III.—*Sarcina*.

Género I.—*Micrococcus*. Cohn.

Células en placas o en masas irregulares. Nunca se presentan en cadenas largas o en paquetes. Gram positivos a Gram negativos, crecimiento en gelosa usualmente abundante, algunas especies no forman pigmentos pero otras lo forman color amarillo o menos comúnmente color naranja o color rojo. Produce algo de ácido en la glucosa; lactosa generalmente no es fermentada. La gelatina es frecuentemente licuada, pero no con rapidez. Son parásitos facultativos y saprófitos.

Clave a las especies del género I *Micrococcus*.

1.—Especies que pueden ser aerobios o facultativos anaerobios.

I.—No forman pigmentos rosa o rojo en gelosa.

A.—No producen nitritos a partir de nitratos.

No patógeno 1.—*Micrococcus luteus*.

" " 2.—*Micrococcus freundenreichii*.

" " 3.—*Micrococcus Ureae*.

" " 4.—*Micrococcus Flavus*.

" " 5.—*Micrococcus Candidus*.

B.—Producen nitritos a partir de nitratos.

1.—Utilizan $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno.

No Patógeno 6.—*Micrococcus Conglomeratus*.

" " 7.—*Micrococcus Varians*.

" " 8.—*Micrococcus Caseolyticus*.

2.—No utilizan $\text{NH}_4 \text{H}_2 \text{PO}_4$ como fuente de nitrógeno.

a.—Licuan gelatina. Fermentan manitol.

b.—Abundante crecimiento naranja en gelosa.

Patógeno 9.—a *Micrococcus Piogenes* (Variedad aureus).

bb.—Abundante crecimiento blanco en gelosa.

Patógeno 9.—b. *Micrococcus Piogenes* (Variedad albus).

bbb.—Crecimiento amarillo en gelosa.

Patógeno 10.—*MICROCOCCUS CITREUS*

aa.—No licuan gelatina, o lo hacen muy lentamente.

b.—Abundante crecimiento blanquecino o naranja en gelosa.

Fermenta manitol.

Patógeno 11.—*MICROCOCCUS AURIANTIACCUS*.

bb.—Crecimiento escaso blanquecino y translúcido en gelosa. No fermenta manitol.

Patógeno 12.—MICROCOCOCCUS EPIDERMITIS.

II.—Forman pigmento rosa o rojo en gelosa.

No Patógeno 13.—Micrococcus roseus.

.. .. 14.—Micrococcus cinnabareus.

.. .. 15.—Micrococcus rubens.

.. .. 16.—Micrococcus rhodochry:

.. .. 17.—Micrococcus agilis.

2.—Especies anaeróbicas.

I.—Forman gas en medios nitro

A.—Acido de glucosa.

Patógeno 18.—Micrococcus aerógenes.

B—No forman ácido de glucosa.

1.—No forman sulfhídrico las colonias en agar profundo.
(colonias incoloras).

Patógeno 19.—Micrococcus asacharoliticus.

2.—Forman sulfhídrico.—Las colonias en agar profundo se
enegrecen.

Patógeno 20.—Micrococcus Niger.

II.—No forman gas en medios nitrogenados.

1.—Acido de glucosa y olatosa.

21.—Micrococcus grigoroffi.

2.—Acido de glucosa no forma ácido de lactosa.

22.—Micrococcus anaerobius.

Género II.—Gaffkya Trevisan.

Se presentan en el cuerpo animal y en medios especiales como
tétradas mientras que en medios de cultivo ordinarios se presentan en
pares o en masas irregulares de aerobios a anaerobios. Gram positivo
organismos parásitos.

CLAVE A LAS ESPECIES DEL GENERO GAFFKYA

I.—Aerobios facultativos.

1.—Gaffkya Tetrágena.

II.—Estrictamente anerobios.

2.—Gaffkya Anaerobios.

Género III.—Sarcina Goodsin

La división se presenta en condiciones favorables en tres planos, produciendo así paquetes de forma regular. Usualmente en gram positivo, abundante crecimiento en gelosa, formándose usualmente un pigmento amarillo o naranja. El caldo lactosado es acidificado ligeramente. El caldo lactosado no es fermentado. Licúa gelatina frecuentemente. Los nitritos pueden o no ser productos de los nitratos. Son saprófitos y parásitos facultativos.

Fam. VII.—*Lactobacteriaceae* Orla-Jensen.

Bastones largos o cortos o cocos los cuales se dividen como los bastones en un plano solamente, formando cadenas pero nunca tétradas o paquetes. No son móviles, exceptuando para algunas cepas de Streptococos. Son Gram-positivos. La producción de pigmentos es rara. Algunas especies forman un pigmento amarillo naranja, rojo o café herrumbroso. El crecimiento en cualquier medio es pobre o ausente. Algunas especies son estrictamente aneróbicas. Los carbohidratos son esenciales para un buen desarrollo, estos carbohidratos son fermentados a ácido láctico algunas especies son ácidos volátiles, alcohol y CO₂ como productos finales (exceptuando los Diplococcus magnus que no son fermentados). La gelatina es muy raramente licuada. No reduce los nitratos a nitritos. Se encuentran regularmente en la boca y en el tracto intestinal del hombre y otros animales, en los productos lácticos, fermentan los jugos vegetales, unos pocos son grandemente patógenos.

Clave a las tribus de la familia Lactobacteraceae.

I.—Cocos que se presentan aislados en pares o en cadenas.

Tribu I.—*Streptococceae*

II.—Bastones que se presentan aislados, en pares o en cadenas. Las células pueden ser muy largas y aun filamentosas.

Tribu II.—*Lactobacillidae*

TRIBU I.—*Streptococceae* Trevisan.

Células esféricas o alargadas, que se dividen en el eje solamente; que usualmente se presentan en pares o en cadenas. Unas cuantas especies son estrictamente anaerobias. Ninguna crece abundantemente en medios sólidos. Los carbohidratos y poli-alcoholes son atacados, ya sea por fermentación a ácido láctico y ácidos acéticos, alcohol y CO₂. Algunas especies patógenas crecen muy pobremente si el medio de cultivo no tiene suero sanguíneo u otros fluidos de enriquecimiento. Son catalasa negativas.

Clave a los géneros de la tribu *Streptococceae*.

I.—Parásitos que crecen pobremente en los medios artificiales. Las células usualmente se presentan en pares y son frecuentemente alargadas. Las especies anaerobias pueden presentarse aunque raramente en tétradas o en pequeños racimos.

Género I.—*Diplococcus*.

II.—Parásitos y saprófitos. Normalmente forman cadenas largas o cortas. Fermentan glucosa a ácido láctico sin que aparezca prácticamente ningún otro ácido o CO₂.

Género II.—*Streptococcus*.

III.—Saprófitos forman cadenas de cocos o de bastones cortos en los jugos vegetales y en la leche. Fermentan glucosa con producción de CO₂, ácido acético y alcohol etílico. Forman manitol a partir de la fructuosa.

Género III.—*Leuconostoc*.

Género I.—*Diplococcus* Weichelbaum.

Células usualmente en pares, algunas veces en cadenas o más raramente en tétradas o en pequeños racimos. Las células jóvenes son Gram-positivo. Son parásitos que algunas veces crecen muy pobremente o no crecen en los medios artificiales. Poder fermentativo, usualmente muy grande; la mayoría de las cepas forman ácido de la glucosa, lactosa, sucrosa e inulina. Las especies aeróbicas son solubles en bilis, mientras que las especies anaeróbicas no son solubles en bilis. Las relaciones entre los diplococcus estrictamente anaerobios colocados en este género por Prevot con los neumococcus no son enteramente claros.

Clavo a las especies del género Diplococcus

II.—Aeróbico, Facultativo, Anaeróbico. Soluble en bilis

1.—Diplococcus Pneumoniae.

II.—Estrictamente Anaeróbicos. No son solubles en bilis.

A.—De más de un micrón de diámetro. No ataca carbohidratos.

2.—Diplococcus magnus.

B.—De menos de un micrón de diámetro.

1.—Forma ácido de la glucosa y la lactosa.

(a).—Encapsulado patógeno.

3.—Diplococcus Palenpneumoniae.

(aa).—No capsulado. No patógeno.

4.—Diplococcus Plagarum.—Belli.

2.—Acido de la glucosa pero no de la lactosa.

(a).—Crece en los medios de cultivo ordinarios. No patógeno.

5.—Diplococcus Constellatus.

(aa).—No crece en los medios de cultivos ordinarios. Patógenos.

6.—Diplococcus Morvillorum.

Género II.—Streptococcus Ronsenback.

Células esféricas u ovoides; rara vez se encuentran alargadas en forma de bastones. Se presentan agrupados en pares, cadenas cortas o cadenas largas, pero nunca en paquetes o en masas zoogléares. Regularmente no forman cápsula, pero en algunas especies y en ciertas condiciones, sí existen en forma conspicua. Son Gram positivos, pero algunas especies se decoloran fácilmente. Unas pocas cepas producen un crecimiento color rojo herrumbroso al ser sembradas en profundidad en la gelosa, o un pigmento que va del amarillo al anaranjado en caldo de almidón. El crecimiento en los medios artificiales es ligero. Las colonias en gelosa, son pequeñas. Las colonias que crecen en la superficie de los medios de cultivo, son translúcidas. Las colonias pueden ser difusas, convexas o mucoides. Algunas especies son estimuladas en su crecimiento por la adición de proteínas naturales. La mayor parte de las especies son anaerobios facultativos, con pequeño crecimiento en la superficie de los medios sembrados en picadura. Unas cuantas especies son estrictamente anaerobios. Algunas de estas últimas especies, atacan las proteínas con producción de gas y olor fétido. La fermentación de los hidrocarbonados por todas las otras especies es homo-fermentativa con formación de ácido láctico dextrógiro como el producto predominante, en tanto que ácidos volátiles u otros productos volátiles y CO₂ puede no producir o ser formados en muy pequeñas cantidades. La milina rara vez es atacada, no reduce nitratos a nitritos. No son solubles en bilis. Frecuentemente acumulan materia orgánica conteniendo azúcares. Regularmente se les encuentra en la boca y en el intestino del hombre y de otros animales. En los productos lácteos y en los jugos de fermentación de las plantas. Algunas especies son grandemente patógenas.

..

NOTA: Parece recomendable aceptar en la clasificación de los STREPTOCOCCUS solamente aquellas especies descritas acerca de las cuales hay un razonable acuerdo entre los investigadores. Los métodos serológicos de clasificación se han incluido, hasta donde ha sido posible, en la clasificación que sigue, pero como el verdadero significado de estos métodos no se conoce, estos métodos serológicos se consideran de secundaria importancia y no en la clasificación primaria. Se han descrito STREPTOCOCCUS móviles ocasionalmente, pero no se sabe si éstos constituyen especies definidas, o bien son cepas

que ocasionalmente aparecen en especies ordinariamente inmóviles. Los streptococcus anaerobios aun no han sido suficientemente estudiados como para estar seguros de si deben incluirseles en el género streptococcus o bien darles un rango genérico separado, aunque sus procesos metabólicos sugieran que deba hacerse esto último.

Clave a las especies del género *Streptococcus*.

I.—Especies anaerobias facultativas.

A.—Grupo pirocénico. No crece a 10° C. No crece a 45° C. Generalmente son Beta hemolíticos. Generalmente no cuajan la leche tor nasolada y reducen el tornasol muy lentamente. Generalmente no fermentan el manitol ni glicerol. No toleran el azul de metileno al 0.1%. No toleran tampoco el Na Cl al 6.5% ni un pH de 9.6. Produce amoniaco a partir de la peptona.

I.—No hidrolizan hipurato de sodio.

a.—Fermentan lactosa.

b.—No fermentan sorbitol, pero sí trehalosa. Grupo A de Lancefield.

Patógeno 1.—*Streptococcus pyogenes*.

bb.—Fermentan sorbitol, no fermentan trehalosa. Grupo C de Lancefield.

No patógeno 2.—*Streptococcus zoopidéricus*.

aa.—La lactosa puede ser o no fermentada. Grupo C de Lancefield.

b.—No fermentan trehalosa.

Más o menos Patógeno. 3.—*Streptococcus equisimilis*.

bb.—Fermenta trehalosa.

Patógeno 4.—*Streptococcus equisimilis*.

II.—Hidrolisán hipurato de sodio. Grupo B de Lancefield.

No patógeno 5.—*Streptococcus agalactiae*.

B.—Grupo *viridans*. No crece a 10° C. Crece a 45° C. con pocas excepciones en cepas de la especie *Streptococcus mitis*. Reduce el tomasol después de cuajar la leche tomasolada. El sorbitol y el glicerol generalmente no son fermentados. El manitol, rara vez es fermentado. No tolera concentraciones de azul de metileno al 0.1%, Na Cl al 6.5% ni un pH de 9.6. No son beta hemolíticos (aunque pueden serlo bajo condiciones anaerobias) pero puede mostrar varios grados de emerdeamiento de la sangre. No produce amoníaco de la pepsina con pocas excepciones, tratándose de especies de *Streptococcus mitis*.

I.—Fermentan lactosa.

a.—No crecen a 50°. Emverdecen o se parten indiferentemente en gelosa sangre. Generalmente fermentan rafinosa, inulina, salicina y dextrina. Generalmente atacan esculina. Crecen con concentraciones de Na Cl al 2%.

b.—No sobreviven a 60° por 30'. Hidrolizan almidón. No toleran la bilis.

c.—Colonias mucoides producidas en medios conteniendo sucrosa o rafinosa.

Patógena 6.—*Streptococcus salivarius*.

cc.—Colonias no mucoides en medios conteniendo sucrosa o rafinosa. No fermentan inulina.

Patógena 7.—*Streptococcus mitis*.

bb.—Sobrevive a 60° por 30' Hidroliza el almidón con excepción de la variedad *inulinaceus*. Toleran la bilis.

Más o menos Patógeno. 8.—*Streptococcus bovis* (y variedades).

aa.—Crece a 50°. No tiene acción sobre la sangre. No ataca esculina ni dextrina ni fermenta rafinosa, inulina, salicina. No crece en concentraciones de Na Cl al 2%.

No patógeno. 9.—*Streptococcus thermophilus*.

2.—No fermenta lactosa, tolera la bilis.

Patógeno más o menos. 10.—*Streptococcus equinus*.

C.—Grupo láctico. Crece a 10°. No crece a 45° C. Reduce el tornasol antes de cuajar la leche tornasolada. No fermenta sorbitol ni glicerol. No es Betahemolítico el grupo. Tolerancia 0.1% de azul de metileno, pero no tolera 6.5% de Na Cl o un pH de 9.6.

1.—Fermentan maltosa y dextrina. Producen amoníaco de la peptona. Crecen a 40° C. Grupo N. de Shattock y Mottik.

No Patógeno. 11.—*Streptococcus lactis*.

2.—No fermentan maltosa. Usualmente no fermentan dextrina, no producen amoníaco de la peptona, no crecen a 40° C.

No Patógeno. 12.—*Streptococcus cremoris*.

D.—Grupo de los *Enterococcus*. Crecen a 10° C. Crecen a 45° C. Usualmente reducen el tornasol antes de coagular la leche tornasolada. Generalmente fermentan sorbitol, glicerol y manitol. Pueden ser o no Beta hemolíticos. Tolerancia azul de metileno en concentración de 0.1% solución de Na Cl al 6.5% y un pH de 9.6 Producen amoníaco a partir de la peptona. Pertenecen al grupo D de Lancefield.

1.—No son Betahemolíticos.

a.—No licúan gelatina.

Patógeno 13.—*Streptococcus faecalis*.

aa.—Licúan gelatina.

Patógeno 14.—*Streptococcus licuefaciens*.

2.—Son Betahemolíticos.

a.—Fermentan manitol y sorbitol.

Patógeno 15.—*Streptococcus zymogenes*.

aa.—No fermentan manitol ni sorbitol.

No patógeno 16.—*Streptococcus durans*.

II.—Especies anaeróbicas.

- A.—*Anaerobius strictos*.
- 1.—Producen gas y olor fétido.
 - a.—Generalmente no enturbian el caldo.
 - b.—Producen ácido en maltosa.
- Patógeno 17.—*Streptococcus anaerobius*.
- bb.—No producen ácido de maltosa.
- Patógeno 18.—*Streptococcus foetidus*.
- aa.—Turbidez en el caldo.
 - b.—No produce gas en gelosa semi-sólida de Veillon.
- No produce gas en agua peptonada.
- Patógeno 19.—*Streptococcus putridus*.
- bb.—Abundante gas en gelosa semi-sólida de Veillon y en agua peptonada.
- Patógeno más o menos 20.—*Streptococcus lanceolatus*.
- 2.—No produce gas ni olor fétido.
 - a.—No coagula en la leche.
- Patógeno 21.—*Streptococcus micros*.
- aa.—Coagula en la leche.
 - b.—Sedimento viscoso en caldo, en gelosa semi-sólida producen colonias negruzcas con el envejecimiento.
- No Patógeno. 22.—*Streptococcus parvulus*.
- bb.—No hay sedimento viscoso en caldo. En gelosa semi-sólida las colonias no se ennegrecen con el tiempo.
- Patógeno 23.—*Streptococcus intermedius*.
- B.—*Microaerofilicos*.
- 1.—Estrictamente anaerobius al ser aislados. Posteriormente se vuelven microaerofilicos.
- Patógeno 24.—*Streptococcus evolutus*.

A.—*Anaerobius strictus*.

1.—Producen gas y olor fétido.

a.—Generalmente no enturbian el caldo.

b.—Producen ácido en maltosa.

Patógeno 17.—*Streptococcus anaerobius*.

bb.—No producen ácido de maltosa.

Patógeno 18.—*Streptococcus foetidus*.

aa.—Turbidez en el caldo.

b.—No produce gas en gelosa semi-sólida de Veillon.

No produce gas en agua peptonada.

Patógeno 19.—*Streptococcus putridus*.

bb.—Abundante gas en gelosa semi-sólida de Veillon y en agua peptonada.

- Patógeno más o menos 20.—*Streptococcus lanceolatus*.

2.—No produce gas ni olor fétido.

a.—No coagula en la leche.

Patógeno 21.—*Streptococcus micros*.

aa.—Coagula en la leche.

b.—Sedimento viscoso en caldo, en gelosa semi-sólida producen colonias negras con el envejecimiento.

No Patógeno. 22.—*Streptococcus parvulus*.

bb.—No hay sedimento viscoso en caldo. En gelosa semi-sólida las colonias no se ennegrecen con el tiempo.

Patógeno 23.—*Streptococcus intermedius*.

B.—*Microaerofilicos*.

1.—Estrictamente anaerobius al ser aislados. Posteriormente se vuelven microaerofilicos.

Patógeno 24.—*Streptococcus evolutus*.

LOS ESTREPTOCOCOS

INTRODUCCION

Ya hemos visto que los estreptococos pertenecen a la familia Lactobacteriácea; a la tribu I Streptococacceae y al género Streptococcus. Dubos (2), los define de la siguiente manera: "Su común denominador es el ser microorganismos Gram positivos, de forma esférica o elíptica, los cuales no son solubles en bilis. Las unidades se presentan en cadena, algunas veces en pares, pero nunca en masas. Se dividen en ángulos rectos con respecto a los ejes largos de las cadenas, las cuales pueden contener de 2 a varios cientos de cocos. Algunos forman cápsulas, otros no. Las colonias discoideas en varios medios sólidos muestran diversos tipos de bordes. Algunas cepas forman pigmento. La acción de los estreptococos sobre la sangre varía de especie a especie y constituye un factor primario que condiciona la clasificación. Diversos carbohidratos son descompuestos con la producción de ácido. La mayoría de las cepas no licúa la gelatina. La mayoría son aerobios y facultativamente anaerobios pero algunos son aerobios obligados".

Los estreptococos se dividen en dos grandes grupos:

- a).—Especies aerobias y facultativamente anaerobias.
- b).—Especies microaerofílicas y anaerobias estrictas.

Los estreptococos aerobios se pueden dividir en cuatro grupos:

- a).—Grupo pirogénico o hemolítico.
- b).—Grupo viridans.
- c).—Grupo láctico que agría la leche.
- d).—Grupo de los enterococos.

Desde que Billroth (citado por Dubos) describió por primera vez los estreptococos en relación con las heridas infectadas y en las erisipelas fueron encontrándose cocos similares en otros tipos de infecciones. Al parecer el primer intento de clasificación fué hecho por P. H. Hiss (citado por Dubos) a principios de este siglo, basándose en la habilidad de diferentes cepas para fermentar carbohidratos. La diferenciación de los estreptococos según su acción sobre los glóbulos rojos "in vitro", en hemolíticos, verdes e indiferentes, fué reconocida primero por Schottmüller (citado por Dubos), habiendo sido Brown en 1919, quien introdujo los términos de alfa, beta y gama para describir ligera hemolisis con enverdecimiento, clara hemolisis, y ningún efecto sobre la hemoglobina respectivamente.

Estos sistemas de clasificación, desde el punto de la capacidad potencial de los gérmenes para producir enfermedad, tienen poco valor, siendo más útiles las clasificaciones de Lancefield en grupos y tipos inmunológicos y la de Griffith en tipos por un procedimiento de aglutinación en placa, pues aunque estos sistemas de clasificación no son tampoco completos, se les ha encontrado más prácticos, particularmente para clasificar las cepas hemolíticas patógenas para el hombre y los animales, aunque se advierte que estas clasificaciones basadas en los componentes inmunológicos de los gérmenes no son aplicables a las cepas no hemolíticas ni a las anaerobias.

En términos generales, es típico de los estreptococos el ser gérmenes inmóviles y de forma cocoide como ya se dijo antes, sin embargo, hay que hacer las siguientes excepciones a estas características.

Aurbeck y Felsenfeld (3) aislaron en un caso de endocarditis un enterococo móvil. Han sido reportados sólo 16 estreptococos móviles siendo todos ellos enterococos, con un solo flagelo el cual se tiñe con nigrosina pero no con la técnica de Leifson (4).

Los estreptococos pueden tener apariencia de bacilos difteroides (5, 6, 7). Lamanna encuentra que esta apariencia difterode es frecuente en los estreptococos aislados en las endocarditis. Tienen apariencia de difteroides por ser en bastón y teñirse irregularmente con las barras y granulaciones propias de los difteroides. Este aspecto difterode lo pueden tener en medios sólidos y en los tejidos, pero estas

cepas en medios líquidos recobran su morfología de cocos en cadenas. Lamanna encuentra también que estos estreptococos crecen mal en gelosa sangre humana a 37° C.; en gelosa sangre de conejo a 37° C crecen mejor, pero hay formas cocoides y formas ovoides; en cambio, tanto en gelosa sangre humana como en la de conejo hay mejor crecimiento de formas cocoides a la temperatura ambiente. Los medios, como la infusión de cerebro y la gelosa semisólida con infusión de cerebro, que tienen un potencial negativo y lejos de la superficie son anaerobios, son los más favorables para dar crecimiento sólo a formas cocoides. Los estreptococos anaerobios facultativos y los microaerófilos crecen más en aerobiosis y dan formas alargadas. En medios sólidos los estreptococos anaerobios tras sucesivos pasos en aerobiosis pueden crecer bastante bien.

Mellen y colaboradores (8), encontraron un estreptococo del grupo A de Lancefield beta-hemolítico que al pasar de su forma lisa a su forma áspera, se tornaba no hemolítico. No diferóide y cambiaba su estructura antigénica, pero podía renacerse otra vez ésta y llegar a ser nuevamente un típico estreptococo hemolítico del grupo A. de Lancefield.

Lamanna (6), explica la forma diferóide diciendo que es una morfología anormal, por ser los estreptococos sensibles al cultivo en condiciones anormales de tipo atmosférico y de temperatura de desarrollo. El tipo de medio de cultivo también los afecta, pudiendo tomar en algunos medios formas no cocoides. Sin embargo, estas formas no son bacilos diferóides, pues en medio sólido no forman catalasa como los verdaderos diferóides (el peróxido de hidrógeno, en dilución, no burbujea cuando se añade al cultivo); en cambio, los verdaderos bacilos diferóides sí forman catalasa. Los estreptococos creciendo en medios adecuados nunca toman la forma diferóide ni forman gránulos metacromáticos. El tamaño y la forma de las bacterias, depende de la velocidad de crecimiento, pero no de la velocidad de división de las células. El medio ambiente ejerce un efecto más deletéreo, lo mismo que las sulfas y penicilina, en la velocidad de división que en la de crecimiento: es por eso, que si la primera se hace más lenta que la segunda, las células toman formas alargadas. Lamanna (6), también explica que es normal en los estreptococos el teñirse desigualmente, pues estas cé-

lulas tienen tendencia a depositar citoplasma más rápidamente en sentido longitudinal que en el transversal y si son inhibidos, por influencias tóxicas, al dividirse, pero no al crecer, perderán su forma de cocos, tomando la de bacilos teñidos desigualmente.

DISTRIBUCION Y GRADO DE PATOGENICIDAD.

Los estreptococos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Donde quiera que el hombre o los animales existan, estos microorganismos se encuentran ya sea como patógenos, comensales o bacterias con vida independiente; en este último estado no dependen directamente de un huésped animal para su supervivencia.

GRUPO LACTICO.

Algunas especies de los estreptococos que agrían la leche, por ejemplo, el *S. lactis*, parece que no necesita de tejidos animales para vivir, pues pueden vivir en las plantas. Este grupo no es patógeno, pero su frecuente presencia en la leche, los hace importantes en la bacteriología. Además es frecuentemente necesario diferenciarlos de los enterococos. A este grupo pertenece también el *S. cremoris*, el cual elabora como el *S. lactis* el antígeno de grupo específico (polisacárido C) que los clasifica en el grupo Serológico N. el *S. thermophilus* pertenece a este grupo láctico, pero es de tipo viridans y no elabora antígeno específico de grupo.

GRUPO DE LOS ENTEROCOCOS.

Los enterococos también están ampliamente distribuidos en la naturaleza, como puede esperarse al considerar que son habitantes normales del intestino humano y de los animales de sangre caliente. Según Ostolenk y Hunter (8), en el tracto intestinal de gatos, caballos, ganado vacuno, cuy, perros, monos, pollos y conejos también se encuentran los enterococos. En la tierra no encontraron estreptococos hemclíticos, pero encontraron *S. faecalis* y *S. liquefaciens* en las plantas. Estos autores describen a los enterococos como más resistentes que los coliformes al cloro que se usa para desinfectar el agua.

La opinión de Niven y Sherman (9) es que los enterococos des-

de el punto de vista de sus requerimientos nutritivos parecen ser un grupo homogéneo. Todos requieren ácido pantoténico, ácido nicotínico, puidoxina y biotina. Todos son capaces de sintetizar tiamina. Algunos requieren riboflavina y ácido fólico. Estos autores describen un medio sintético en el cual pueden desarrollarse fácilmente los enterococos.

Campbell y Gunsalus (10), encontraron que los enterococos en general, utilizan grandemente los citratos como fuente de energía. El *S. lactis* no utiliza los citratos. Sin embargo, los autores encontraron también una cepa de *S. faecalis* que no lo utilizaba. El hecho de que los enterococos utilicen los citratos, coloca estos gérmenes entre los homofermentativos, pues los gérmenes heterofermentativos requieren un carbohidrato utilizable como fuente de energía. Los estreptococos que estos autores estudiaron y que utilizaron grandemente los citratos son los *S. faecalis*, *liquefaciens* y *zymogenes*, en tanto que los *S. mastitidis* y *lactis* no los utilizaron.

Gunsalus y colaboradores (11) presentan un ejemplo interesante de cómo es necesario diferenciar los *S. lactis* de los enterococos, pues encontraron que un germen considerado como típico *S. lactis*, era un enterococo. Estos autores describen en los *S. lactis* un gran poder reductor sobre el tornasol y gran capacidad para licuar la gelatina; sin embargo, encuentran que estos gérmenes carecen de las características biológicas típicas de los enterococos. Los enterococos además poseen un sistema enzimático característico, que es la carboxilasa a la tirosina.

Winter y Sandholzer (12) y Evans y Chinn (13), caracterizan a los enterococos por:

1. Ser cocos Gram positivos.
2. Por pertenecer al grupo D. de Lancefield.
3. Por sobrevivir al calentamiento a 60° C. durante 30 minutos.
4. Por su capacidad de crecer en solución de cloruro de sodio al 6.5 %.
5. Por su capacidad de crecer a temperaturas de 10° C. y 42° C.
6. Por su capacidad de crecer en bilis a 40 %.

7. Por su capacidad de crecer en solución de azul de metileno al 0.1 %.
8. Por reducir al tornasol en leche descremada antes de cuajarla.
9. Por fermentar el glicerol en aerobiosis.
10. Por no producir catalasa.

Ostrolenk y Hunter, (8), recomiendan el medio S. S. de Hajan y Perry con 6.5% de NaCl para aislar enterococos y Winter y Sandholzer (12), usan el medio de White y Sherman que contiene azida de sodio (Na₂N₃) y penicilina y que se descubrió para aislar estafilococos, para aislar los enterococos, pero añadiéndole doble cantidad de penicilina y 0.001 % de azul de metileno.

Evans y Chinn (13) entre otros, consideran a este grupo de estreptococos como de gran importancia en la patología humana, pues son capaces de producir apendicitis, infecciones purulentas debido a contaminación de lesiones intestinales o de la vejiga urinaria; infecciones puerperales, otitis media, mastoiditis, meningitis y endocarditis subagudas. Por el contrario, los enterococos raras veces son capaces de producir infecciones del aparato respiratorio. Elaboran un antígeno específico de grupo (polisacárido C.) y pertenecen serológicamente hablando al grupo D. de Lancefield.

GRUPO VIRIDANS.

Los estreptococos del grupo viridans no causan hemólisis beta en los eritrocitos, pero algunos pueden inducir la llamada hemólisis alfa; algunos hacen a la hemoglobina café o verde, mientras que otros no afectan la sangre, es decir, son indiferentes, y se les denomina gama.

Hay amplias variaciones respecto a la alteración verdosa que causan en la hemoglobina, lo cual depende en parte de la sangre empleada y en parte de las facultades de cada especie para alterarla, por lo cual algunas especies producen mucho pigmento y otras muy poco o ninguno.

Los estreptococos viridans, en contraste con los estreptococos de los grupos serológicos comúnmente reconocidos, no parecen producir el carbohidrato somático "C", por medio del cual se les pueda dividir en grupos. Sin embargo, no se puede afirmar categóricamente que las cepas viridans no elaboren estos antígenos específicos de grupo, sino más bien que no se les ha encontrado.

En muchos aspectos los estreptococos viridans se semejan a los neumococos, de los cuales muchas veces sólo se les puede diferenciar basándose en que no son solubles en bilis; por otra parte, se semejan a los estreptococos hemolíticos en su reacción ante el azul de metileno y otras características fisiológicas.

Chapman y Berens (14), encuentran que el *S. mitis* es tan frecuentemente como el *S. salivarius* en la faringe y en las heces humanas, pero que el *S. mitis* es más frecuente que el *salivarius* en la cavidad nasal y en los tejidos dental y peridental.

Niven y White (15) aislaron 110 cepas de estreptococos en 100 casos de endocarditis bacteriana. Estos estreptococos fueron clasificados de la siguiente manera:

Especie o variedad.	No. de Cepas.
<i>S. mitis</i>	45
<i>S. S. V. G.</i>	42
<i>S. bovis</i>	12
<i>S. faecalis</i>	5
<i>S. agalactiae</i>	1
<i>S. del grupo C de Lancefield</i>	1
No clasificados	4

Es notable la baja incidencia de enterococos y la ausencia de *salivarius* en esta serie. El *S. mitis*, es el *S. viridans* que habitualmente se encuentra en las heces humanas. Sin embargo, el *S. salivarius* frecuentemente se ha encontrado por otros autores causando endocarditis bacterianas, en las lesiones de la boca y nariz y ocasionalmente en los pulmones, lo mismo que en bocas e intestinos humanos aparentemente normales.

White y Niven (5), aislaron en una tercera parte de los casos de una serie de endocarditis bacteriana, un *S. viridans* resistente a la penicilina, pero que no tenía características de enterococo. A estos estreptococos los denominaron S. B. E. No se han aislado de la garganta humana, pero como son tolerantes a la bilis los autores creen que pueden ser habitantes normales del intestino humano. Se les ha llamado también *S. sanguis*. Algunas veces presentan aspecto difteroides en los medios de cultivo.

Otra variedad de *S. viridans*, son los llamados M. G. que se han encontrado en bocas humanas normales, pero que parecen tener algunas relaciones simbióticas en muchos casos de neumonías atípicas.

El *S. bovis*, también *S. de Bagen* es habitante del intestino bovino; frecuentemente se encuentran en el intestino humano y se le ha encontrado ocasionalmente causando endocarditis subagudas. Otro estreptococo potencialmente patógeno al hombre es el *S. equinus*, el cual es habitante normal del intestino del caballo. Se le ha encontrado en exudados inflamatorios de los tractos génitourinarios y gastrointestinal del hombre. El *S. viridans* no elabora el polisacárido específico de grupo, (antígeno C).

GRUPO HEMOLITICO O PIROGENICO.

Los *S.* de este grupo, son casi todos hemolíticos en gelosa sangre y la mayoría de ellos producen hemolisina soluble en caldo con suero sanguíneo. Todos elaboran el polisacárido específico de grupo (antígeno C), lo que permite clasificarlos en los grupos: A. B. C. E. F. G. H. L. M. de Lancefield.

Evans, (17) dió las bases de cómo clasificar los estreptococos de los grupos A y C que adopta el manual de Bergey, basándose en fermentaciones de lactosa, trealosa y sorbitol.

Evans (17), también dió las bases para clasificar e identificar el *S. equisimilis*; pertenece al grupo piogénico de estreptococos aerobios que no hidrolizan hipurato de sodio. Este grupo piogénico incluye todas las cepas de estreptococos de los grupos A y C de Lancefield. Este estreptococo *equisimilis* se caracteriza por precipitar con suero del

grupo C, fermentar trehalosa, no fermentar sorbitol y fermentar irregularmente la lactosa. Este estreptococo puede ser de origen animal o humano; en el hombre es capaz de producir erisipelas, fiebre puerperal, escarlatinas, etc. Pero sólo se le ha encontrado en el 3 % de los casos de estas enfermedades. Tienen tendencia a infectar otras partes del cuerpo humano que no sea la garganta.

Evans (18), estudiando 326 cepas del grupo A. de origen humano, encuentra que todos estos estreptococos hemolíticos produjeron ácido en trehalosa y que ninguno atacó el sorbitol. El *S. scarlatinae* ataca la salicina, lo cual lo diferencia de las otras especies. Los *S.* de los grupos piógenos y epidémicos fermentan la lactosa y no el manitol, lo cual los diferencia de los otros grupos; además nunca varían estas características, lo contrario de lo que pasa en otros grupos, en donde los estreptococos pueden volverse lactosa negativos y manitol positivos. Las reacciones de fermentación son similares entre los grupos epidémicos y piógenos.

Es de suma importancia en el estudio de los *S.* el saber que existen fenómenos de variación por los cuales se puedan cambiar las características biológicas de los gérmenes. Un ejemplo de estas variaciones la dan Morton y Sommer (19), los cuales estudiando un estreptococo hemolítico del grupo C. obtuvieron colonias mucoides entre las que se encontraron variantes no hemolíticas. Las colonias mucoides no fermentaron lactosa y trehalosa, pero sí fermentaron sorbitol y manitol. En cambio, los gérmenes de las colonias lisas y enanas, que estos autores obtuvieron con el mismo estreptococo fermentaron lactosa y trehalosa pero no sorbitol y manitol.

Rammelkamp y Dingle (20), clasifican los estreptococos beta-hemolíticos en grupos y tipos por grupos serológicos de acuerdo con las ideas de Lancefield. El grupo específico depende de un polisacárido conocido como substancia "C", el cual se extrae por los métodos de Lancefield o el de Fuller.

El polisacárido es parte integrante de la célula, no es tóxico, y no tiene relación con la inmunidad; para determinar el grupo se pone en contacto con suero específico, con el extracto obtenido por los métodos de Lancefield o de Fuller usando métodos de precipitación.

Se han encontrado más de 12 grupos serológicos de estreptococos. Al parecer los estreptococos del grupo A, son los causantes de la mayoría de las infecciones en el hombre, aunque es probable que todos los grupos pueden ser patógenos en condiciones favorables. En la composición antigénica de los estreptococos del grupo A se han encontrado 2 substancias designadas con las letras M y T, que determinan el tipo específico del estreptococo.

El antígeno M es una proteína que se encuentra en la superficie de la célula y que está en íntima relación con la virulencia. Se han encontrado anticuerpos específicos M después de infecciones naturales en el hombre. La substancia T se encuentra en la célula misma, es una proteína que es antigénica, pero los anticuerpos que producen no protegen al animal contra infecciones por organismos que contengan el mismo antígeno T. La determinación del grupo de los estreptococos beta-hemolíticos se realiza por medio de las técnicas de aglutinación de Griffith o por las de precipitación de Lancefield o de Fuller. La técnica de aglutinación depende de los antígenos T y en un menor grado del antígeno M; en cambio, la reacción de precipitación depende del antígeno M solamente.

HEMOLISINAS

Actualmente se sabe que la reacción hemolítica de los estreptococos no es constante, pues cepas que producen hemolisis en sangre humana sólo producen enverdecimiento en sangre de conejo; al parecer, la sangre humana es la que menos atacan los estreptococos hemolizándola, según algunos autores, pero esto es rebatido por otros.

Pike juzga que lo mejor es la sangre humana y luego la de conejo; la sangre de carnero y la sangre humana sirven para diferenciar los estreptococos hemolíticos de los *Hemophylus hemoliticus*. Las variantes no hemolíticas de los estreptococos beta-hemolíticos son un problema, pues son capaces de producir enfermedad. El mejor medio para estudiar la hemolisis es por medio de placas mezcladas; los autores recomiendan la modificación de Perry y Petran, la cual consiste en ha-

cer una siembra en una placa de gelosa sangre, por medio de un hisopo y luego se añade gelosa sangre en una segunda capa.

Se ha encontrado que ciertas cepas de estreptococos muestran hemolisis beta cuando se cultivan en anaerobiosis, pero no cuando se cultivan en aerobiosis. Se ha encontrado que las cepas que producen estreptolisina S, pero no estreptolisina O, producen hemolisis tanto cuando se cultivan en la superficie como en la profundidad de placas de gelosa sangre. Las cepas que producen sólo estreptolisina O, no muestran hemolisis cuando se siembran en la superficie de placas de gelosa sangre y aunque se incuben en aerobiosis o anaerobiosis; sin embargo, estas cepas que sólo producen estreptolisina O, muestran buena hemolisis cuando se siembran en placas mezcladas. De esto se concluye que la hemolisis producida por las colonias de la superficie del medio de cultivo era debida a la estreptolisina S, siendo oxidada y por lo tanto inactivada la estreptolisina O; sin embargo en la baja tensión de oxígeno a que se encuentran las colonias profundas, tanto la estreptolisina O, como la S, causan hemolisis en ausencia completa de oxígeno la estreptolisina O es también inactiva. Por lo tanto, con las cepas que producen sólo estreptolisina O no puede manifestarse siempre la presencia de hemolisina, haciendo las siembras rutinarias en la superficie de placas de gelosa sangre.

La presencia de títulos altos de antiestreptolisina en la sangre empleada para hacer el medio de cultivo, puede también inhibir la producción de hemolisis por los estreptococos hemolíticos.

No se sabe con seguridad con que frecuencia se presentan las cepas de estreptococos del grupo A que sólo producen estreptolisina O.

La frecuencia con que no se aíslan los estreptococos beta-hemolíticos en pacientes con escarlatina, puede ser indicio de que los estreptococos que estén causando en estos pacientes la enfermedad sean cepas de estreptococos que sólo producen estreptolisina O.

Consideramos que es necesario estudiar más cuál es el tipo de sangre que debe emplearse en el estudio de la hemolisis por los estreptococos y las ventajas o desventajas de las siembras en las superficies de las placas, el uso de placas mezcladas y el uso también de placas

de gelosa en las que primero se hace la sombra y luego se añade una segunda capa de gelosa sangre.

FIBRINOLISINA

Christensen (21), dice que la fibrinolisina producida por los estreptococos sólo actúa al ser activada por el factor lisina de Milstone. Es posible que el "factor lisina" sea la proteosa de suero la cual normalmente está en la sangre en estado inactivo. La fibrinolisina es también activa para la gelatina, la caseína y la hemoglobina.

Rammelkamp y Dingle (20), dicen que la fibrinolisina es una enzima capaz de lisar los coágulos de fibrina humana. No es tripsina, la fibrinolisina activada destruye la protrombina. Actualmente se llama también estreptoquinasa a la fibrinolisina. Se llama plasminogen o substancia globulínica al factor lítico y plasmina a la enzima activada. Las substancias inhibitorias se llaman antiestreptoquinasa y antiplasmina.

La resistencia que oponen los coágulos de plasma a la lisis por la enzima de los estreptococos, aunque se observa en la sangre de los pacientes convalcientes de enfermedades causadas por estreptococos, también se observa con los coágulos del recién nacido y de una gran cantidad de pacientes con diversas otras enfermedades no estreptocócicas. Esta resistencia del plasma a la fibrinolisina puede ser debida:

a).—A la presencia de una antifibrinolisina específica.

b).—A la presencia de antiproteosa (antiplasmina), o a la presencia de antiplasminogeno.

c).—A deficiencia del factor lítico (plasminógeno).

La fibrinolisina la producen estreptococos de los grupos A, C, G abundantemente. Los estreptococos de los grupos D y F también la producen pero en cantidades muy pequeñas. Los estreptococos del grupo A habitualmente producen mucha fibrinolisina, los del grupo C en pequeñas cantidades. Es de observarse que dentro del grupo A hay cepas de estreptococos que producen mucha fibrinolisina y otras ce-

pas que la producen en pequeña cantidad, siendo la producción de fibrinolisisina relativamente constante para cada cepa. Es de interés observar que los organismos que producen mucha proteínasa no producen fibrinolisisina.

Se ha encontrado que los sueros que tienen mucha antifibrinolisisina usualmente muestran altos títulos de antiestreptolisina, sin embargo, lo contrario no es cierto, pues sueros con mucha antiestreptolisina pueden tener niveles normales de antifibrinolisisina. Habitualmente las personas que no tienen estreptococos beta-hemolíticos en la garganta, tienen el suero pocas unidades de antifibrinolisisina. Aunque todos los pacientes de enfermedades estreptocócicas muestran un aumento de las antiestreptolisinas en las convalecencias, sólo el 37 % de los pacientes muestra una elevación en los títulos de la antifibrinolisisina.

Hay discrepancia en la frecuencia con que aumenta la fibrinolisisina en las enfermedades estreptocócicas al ser determinada por las pruebas de resistencia del coágulo de plasma, y la prueba cuantitativa, siendo la primera la que da respuestas mayores.

PROTEINASA

Los estreptococos hemolíticos del grupo A producen una enzima proteolítica extracelular o proteínasa (20). Esta enzima digiere los antígenos M de los estreptococos, la fibrinolisisina (estreptoquinasa), la fibrina, la caseína y la leche.

Esta proteínasa estreptocócica es activa sólo en determinadas condiciones. Esta enzima puede aislarse en los sueros de convalecientes. La producción de enzima no tiene relación con el tipo serológico del organismo ni con las características propias de la infección.

ACIDO HIALURONICO Y HIALURONIDASA

Se encuentra en la cápsula de los estreptococos de los grupos A y C el ácido hialurónico y la hialuronidasa, la cual es una diastasa. La hialuronidasa se ha encontrado en las capas superiores de los cultivos

de estreptococos hemolíticos. El ácido hialurónico se ha encontrado en las cepas mucoides o "Matt". Aunque sólo se encuentra en las cepas encapsuladas no todos los estreptococos con cápsulas contienen este mucopolisacárido. Se han encontrado estreptococos encapsulados que carecen de ácido hialurónico en los grupos A, B, C, G y M. Las cápsulas de los estreptococos de los grupos A y C desaparecen con la adición de extractos testiculares de sanguijuelas y con hialuronidasa de estreptococos del grupo C. La cápsula de los estreptococos del grupo B no se afecta. El ácido hialurónico parece ser un factor muy importante en la virulencia de los estreptococos, pues el extracto de sanguijuela, así como la hialuronidasa puede proteger a los ratones inoculados con dosis letales de estreptococos encapsulados del grupo C. En el ser humano se ha encontrado que estreptococos del grupo A que produce infecciones muy severas produciendo más ácido hialurónico que los estreptococos aislados de infecciones ligeras. Estudios "in vitro" han demostrado que los estreptococos del grupo A tratados con hialuronidasa son más susceptibles a la fagocitosis por los leucocitos humanos, que los no tratados. Se ha encontrado que la determinación cuantitativa del mucopolisacárido es un índice más de fiar y más seguro que la producción de ácido hialurónico, que la demostración de las cápsulas o que la morfología de las colonias en varios medios de cultivo, sin embargo, no es posible indicar ninguna estrecha relación entre la virulencia de los estreptococos para el hombre y la encapsulación y producción de ácido hialurónico.

Se ha estudiado la hialuronidasa en virtud de su probable capacidad de actuar como factor de diseminación de la infección.

La producción de la hialuronidasa por los estreptococos "in vitro", se encontró normalmente por la adición de hialuronato al medio de cultivo; al parecer la hialuronidasa se forma menos en los estreptococos del grupo A que en los estreptococos de los grupos C, G y L. No está bien claro el que la hialuronidasa actúe como factor de difusión de los estreptococos, sin embargo, las cepas encapsuladas son más aptas para producir lesiones localizadas, en tanto que las cepas que producen hialuronidasa se relaciona más bien con infecciones generalizadas. Poca relación se ha encontrado entre la producción de hialuronidasa y la virulencia para el hombre.

Se han encontrado estreptococos productores de hialuronidasa en individuos sanos. A pesar de que relativamente pocos tipos (clasificación según técnica de Griffith) de estreptococos del grupo A producen cantidades apreciables de hialuronidasa, se ha encontrado que pacientes con fiebre reumática muestran altos títulos inhibitorios para la hialuronidasa, es decir, que hay gran cantidad de anti-hialuronidasa en su suero sanguíneo; en cambio hay títulos moderadamente altos de hialuronidasa en la escarlatina y en comparación con los títulos encontrados en los individuos normales.

TOXINA ERITROGENETICA

Hay dos toxinas eritrogenéticas llamadas A y B (20). Los individuos Dick positivos reaccionan a la toxina A y no a la B lo cual puede explicar que los individuos Dick negativos algunas veces pueden desarrollar fiebre escarlatinosa y otros que tienen antitoxina en la sangre durante la convalecencia de escarlatina sigan siendo Dick positivos.

LOS ESTAFILOCOCOS

Estos gérmenes son miembros del gran grupo de los micrococos, entre los que hay muchas especies saprófitas, pero morfológicamente similares a los estafilococos.

Hasta hace poco se clasificaba a los estafilococos en un género separado llamado *Staphylococcus*, pero recientemente ya se les clasifica dentro del género *Micrococcus*, el cual pertenece a la familia *Micrococcaceae*. Este acuerdo es ampliamente aceptado entre otros por Foubert y Douglas (22). Sin embargo, la costumbre de referirse a los micrococos patógenos como estafilococos, es apoyada por su uso constante por algo más de sesenta años.

Basándonos en la anterior el término "estafilococo", lo usaremos en las siguientes páginas:

DISTRIBUCION

Los micrococos están ampliamente distribuidos en la naturaleza y están constantemente presentes en el medio ambiente que rodea al hombre, pudiéndose encontrar en el aire, polvo, agua, piel y artículos de uso diario. Estas cepas son habitualmente saprófitas. Los estafilococos parásitos, sin embargo, forman parte permanente de la flora bacteriana de la piel y nasofarige. En la piel se les encuentra frecuentemente en los folículos pilosos y en los conductos de las glándulas sebáceas. Las formas potencialmente patógenas se encuentran constantemente en la piel o en la nariz en aproximadamente el 20% y 50%, respectivamente de todos los individuos. Cuando los estafilococos pa-

tógenos se encuentran en el medio ambiente, debe suponerse que proviene de fuentes humanas o animales.

Las infecciones estafilocócicas pueden ocurrir espontáneamente tanto en hombres como en animales. Aunque el ser humano es especialmente susceptible a los estafilococos, no es raro encontrar abscesos por estafilococos en los tejidos blandos y huesos del ganado vacuno y caballo, y entre otros animales domésticos. Aunque la mastitis de los bovinos es causada habitualmente por estreptococos, no es raro que también la causen los estafilococos.

Los estafilococos son células esféricas Gram positivas que típicamente se presentan en masas irregulares. Son facultativamente anaerobios, aunque algunas especies son estrictamente anaerobias. En preparaciones hechas de medios líquidos, las masas son pequeñas; pueden verse también células aisladas, en pares o en cadenas cortas, aunque nunca se encuentran cadenas largas. En los frotis hechos de pus o de otros materiales patológicos, la agrupación de las células es similar a la encontrada en los medios líquidos. Los estafilococos no forman esporas y nunca son móviles. Estos gérmenes en cultivo de menos de 24 hrs. son invariablemente Gram positivos, sin embargo en cultivos viejos pueden tomarse Gram negativas algunas células.

En general los estafilococos son de tamaño menor y más uniformes en su agrupación y tamaño que los otros micrococcos puramente saprófitos.

La mayor parte de los estafilococos licúan la gelatina. Fermentan diversos carbohidratos, particularmente glucosa, lactosa, sucrosa y manitol, con producción de ácido láctico pero no de gas. Reducen los nitratos a nitritos. Acidifican la leche y algunas veces la coagulan. Nunca forman indol. Habitualmente hemolisan la sangre. Crecen en medios sólidos fácilmente, produciendo un pigmento que va de amarillo oro intenso a blanquecino, encontrándose también el color verde amarillento. El pigmento nunca es formado en medios líquidos. La aparición del color puede apreciarse usualmente después de incubación a 37 grados centígrados durante 24 horas, pero se intensifica cuando el cultivo se mantiene a la temperatura ambiente un día o dos. En el estudio de la producción de pigmentos en los estafilocos

cos, Chapman (23), recomienda el uso del medio de cultivo llamado Staphylococcus Medium No. 110 "Disco" (24), pues en medios de cultivo como éste el desarrollo del poder cromogénico es muy grande y mayor que en cualquier otro medio de cultivo incluyendo el cultivo por diez días en gelosa leche a la temperatura ambiente, sin embargo, cuando en este medio de cultivo se produce pigmento a 37°C. después de cultivar 12 horas; debe hacerse el cultivo diez días a la temperatura ambiente en este mismo medio de cultivo. El medio de cultivo antes mencionado también es bueno para conservar cepas y evitar que los estafilococos pierdan sus poderes cromogénicos y hemolíticos; además muchas cepas enterotoxigenéticas y no enterotoxigenéticas producen mejor la gelatinasa (enzima que les permite licuar la gelatina), es decir, en este medio de cultivo se vuelven "Stone positivas" cepa que desarrolladas en otro medio de cultivo, no licúan la gelatina. En anaerobios los estafilococos no producen pigmento.

Los estafilococos son normalmente parásitos de la piel y de las mucosas del hombre, causando numerosas infecciones supuradas. Las cepas patógenas para el hombre y los animales usualmente son cuagulara positiva.

Las infecciones producidas por los estafilococos presentan gran variedad de formas clínicas, frecuentemente caracterizadas por supuraciones y que van desde leves pústulas localizadas a fulminantes septicemias. Pueden causar furúnculos, ostiomiелitis y numerosos abscesos de los tejidos blandos. Son frecuentemente los agentes causales de infecciones purulentas de las heridas traumáticas y quirúrgicas y ocasionalmente de pneumonías, meningitis, pleuritis, peritonitis y sinovitis.

El tipo más frecuente de intoxicación por alimentos es causado por estafilococos.

TOXINAS Y ENZIMAS

Los estafilococos elaboran varias toxinas y enzimas que contribuyen en diversos grados a producir enfermedad.

Una de estas toxinas es una exotoxina soluble, filtrable y termolábil, que produce necrosis de los tejidos o bien mata a los animales en experimentación y que hemoliza los eritrocitos de conejo. Esta exotoxina es antigénica.

Producen también los estafilococos tres diferentes hemolisinas (hemotoxinas) que han sido designadas como alfa-hemolisina, beta-hemolisina y gama-hemolisina (25,26).

Los eritrocitos de conejo son muy susceptibles a la lisis con la hemolisina alfa, la cual se produce en una hora a 37°C. por filtrados de cultivos que contengan la toxina. En cambio los eritrocitos humanos son bastante resistentes a esta hemolisina. Como estas tres hemolisinas se encuentran constantemente en cantidades semejantes, en los filtrados tóxicos se consideran como una sola entidad que es capaz de producir estas tres reacciones:

- 1.—Hemolisis de eritrocitos de conejos.
- 2.—Necrosis de los tejidos.
- 3.—Muerte.

La exotoxina que hemoliza los eritrocitos de conejo es producida principalmente por los estafilococos patógenos para el hombre. La hemolisina beta es producida principalmente por los estafilococos patógenos para los animales y ocasionalmente por las cepas humanas; esta hemolisina beta no tiene relación con la patogenicidad de los estafilococos para el hombre. La hemolisina gama también hemoliza los eritrocitos de conejo y no se ha demostrado que tenga relación con la patogenicidad de los gérmenes para el hombre. Las tres hemolisinas son antigénicamente diferentes.

La primera sustancia tóxica que fué estudiada en los estafilococos es la leucocidina, la cual tiene acción destructiva sobre los leucocitos. La leucocidina es producida por la mayoría de los estafilococos patógenos, particularmente por aquellos que destruyen los tejidos. La leucocidina es soluble, filtrable, más lábil que la exotoxina y es antigénica.

Ciertas cepas de estafilococos producen una enterotoxina que

causa los síntomas agudos gastro-intestinales, que se producen en las intoxicaciones por alimentos. Aunque las cepas enterotoxigenéticas están ampliamente distribuidas, parece que constituyen sólo una pequeña proporción de todos los estafilococos patógenos. Por coincidencia muchas cepas producen tanto exotoxinas como entero-toxinas. Una propiedad característica de la enterotoxina es el ser termoestable. Resiste la ebullición durante 30 minutos en contraste con la rápida destrucción de la exotoxina a 60°C. Además se diferencia de la beta hemolisina por tener esta última poca estabilidad al calor.

Una característica exclusiva y muy particular de los estafilococos es su capacidad de coagular el plasma sanguíneo. Esta coagulación es producida por una enzima, la coagulasa, la cual es formada sólo por los estafilococos patógenos tanto de origen animal como humano; las cepas no patógenas, no son capaces de coagular el plasma. La coagulasa es filtrable y termoestable y no parece ser antigénica. Bajo condiciones adecuadas también es posible que la coagulasa actúe sobre soluciones de fibrinógeno coagulándolo. Al parecer la coagulasa es inactiva por sí misma, desde el punto de vista de la conversión del fibrinógeno en fibrina y se requiere para que se vuelva activa de una substancia precursora de otra substancia semejante a la trombina, la cual requiere la participación de una substancia activadora. Esta substancia activadora, la cual es de naturaleza desconocida se encuentra en cantidades adecuadas en los plasmas de conejo o en los humanos, pero está ausente o en cantidad ínfima en otras. La presencia o ausencia de esta substancia activadora explica la susceptibilidad o resistencia de los plasmas de las diferentes especies animales para ser coagulados por la coagulasa y las variaciones individuales que se observan en los plasmas de una misma especie.

Evans y Niven (27), encuentran que el medio de Chapman Stone (24), es de poco valor para identificar los estafilococos que producen enterotoxinas. Los autores encuentran también, que todas las cepas productoras de enterotoxinas a juzgar por las pruebas practicadas en monos, son coagulosa positivas pero que hay algunas cepas también coagulosa positivas, que no producen enterotoxinas. Los autores consideran también posible que haya cepas coagulosa negativas capaces de producir intoxicaciones intestinales por alimentos. Estos

autores demuestran que no hay ninguna prueba fisiológica que tenga valor absoluto para diferenciar las cepas tóxicas de las no tóxicas; entre estas pruebas fisiológicas se encuentran:

- a).—La fermentación de los hidrocarbonados más comunes.
- b).—La hidrólisis de la gelatina, la del almidón, la del hipurato de sodio, la de la esculina y la de la arginina.
- c).—El estudio de la producción de pigmento, de acetoina y de catalasa.
- d).—La reducción de nitratos a nitritos.

CHAPMAN (28) hace notar que la sangre almacenada pierde gradualmente su capacidad de ser coagulada por los estafilococos y que no todas las sangres humanas completas ni todos los plasmas puros son igualmente susceptibles de ser coagulados. El autor halla que menos del 50% de las sangres humanas completas son capaces de ser coaguladas por los estafilococos. Este investigador encuentra que hay relación entre la cantidad de estafilococos en la nariz y garganta y la capacidad de la sangre de esa persona de ser coagulada. A mayor número de estafilococos menor coagulación de sangre.

CHAPMAN (29), aconseja el uso de plasma de conejo, pues a su juicio es mejor que el plasma humano para estudiar la producción de coagulasa, pues el plasma humano tarda más tiempo en ser coagulado y el coágulo es de consistencia menos firme. El autor encuentra que la sangre humana entera es coagulada más rápidamente que el plasma humano puro.

Evans, Buettner y Niven (30), demostraron que prácticamente todos los estafilococos coagulasa positivos son capaces de producir enterotoxinas a juzgar por el método que ellos consideran más satisfactorio y el cual consiste en pasar al estómago de monos Rhesus filtrados de estafilococos; por el contrario, todas las cepas coagulasa negativas no producen enterotoxinas, también juzgado esto por pruebas hechas en monos. Los autores encuentran que al examinar alimentos sospechosos de haber producido envenenamientos, es frecuente en

contrar estafilococos coagulasa positivos junto con numerosos cepas coagulasa negativas. Los estafilococos coagulasa positiva fueron aislados de gelosa manitol con rojo de fenol y 7.5% de cloruro de sodio (Mannitol salt agar) "Difco" (24).

CHAPMAN (31), recomienda practicar la prueba de la coagulasa con gérmenes que se hayan desarrollado en un medio de cultivo que contenga cloruro de sodio en concentración de 7.5%. Al parecer el Na Cl, activa el poder de los estafilococos para coagular la sangre entera o el plasma. (23)

CHAPMAN (32), recomienda incubar los estafilococos que estén creciendo en cualquier medio de cultivo a 30°C., pues a esta temperatura la producción de pigmento es más intensa, se mejora la coagulación de la sangre y la producción de ácido en manitol se hace tan intensa como a 44 grados C.

Yesair y colaboradores (33), indican un medio sencillo de diferenciar los micrococos de los enterococos; con el grado de humedad normal que existe en los medios de cultivo, los estafilococos mueren a 55°C. entre 30 y 45 minutos, en cambio los enterococos resisten 60°C. durante 30 minutos.

Foubert y Douglas (22), estudiando micrococos anaerobios usaron un medio líquido semejante al de tioglicolato. Encontraron que todos los gérmenes estudiados mostraron ser estrictamente anaerobios y sin tendencia a volverse anaerobios facultativos; ninguno produjo hemólisis ni coagulasa. Todos produjeron catalasa a la temperatura óptima de crecimiento que fué de 37°C. La mayor parte de las cepas estudiadas eran blanquecinas o grisáceas, pero algunas cepas que fermentaron lactato tenían color, el que iba del amarillo claro al amarillo café. Estas cepas formadores de pigmento se volvían Gram negativa después de unas 12 horas de crecimiento. Sin embargo, inicialmente todas las cepas estudiadas, eran Gram positivas. Ninguna de las cepas estudiadas era de gérmenes capsulados o móviles y no producían endosporas. La mayor parte de las cepas formaban masas típicas de micrococos de tamaño uniforme, encontrándose las células en los cultivos jóvenes, agrupados ya sea en pares o en tétradas libres.

Una cepa presentó pleomorfismo extremo, mostrando elementos alargados en forma de masas, algunos de ellos con formaciones semejantes a las yemas. Los autores hacen notar que los organismos que consistentemente forman tétradas, no deben colocarse en el género *Micrococcus*, sino en el género *Gaffkya*. Estos autores dan la clasificación hasta especies, de los micrococos anaerobios.

Los estafilococos producen una enzima la fibrinolisisina la cual disuelve los coágulos de fibrina. Esta enzima solo la producen dos cepas humanas coagulasa positivas. Muy raras cepas de origen animal producen fibrinolisisina. En contraste con la rapidez con que actúan la fibrinolisisina de los estreptococos hemolíticos (la cual actúa en ocasiones en sólo pocos minutos), la lisis de los coágulos por estafilococos requiere de varias horas a 2 o 3 días. La lisis de los coágulos de fibrina por los estafilococos se demuestra añadiendo estafilococos al plasma o a la solución de fibrinógeno, la cual es entonces coagulada inmediatamente por la adición de calcio o trombina e incubando la mezcla a 37°C. Los coágulos de fibrina humana o de conejo son particularmente susceptibles para la demostración de la fibrinolisisina de los estafilococos. La fibrinolisisina es filtrable, termoestable y antigénica.

Los estafilococos, como otras bacterias patógenas producen un factor de difusión por medio del cual aumentan la permeabilidad del tejido conectivo, ayudando así a la formación de la lesión local. Este factor es del tipo de las enzimas mucolíticas o hialuronidazas. Este factor de difusión no es tóxico por sí mismo pero facilita la dispersión de los estafilococos y de sus productos tóxicos.

Según Lyons los estafilococos forman cápsula en cultivos muy jóvenes (3 horas), la cual no es demostrable por formas más viejas. El trabajo de este autor debe ser comprobado antes de aceptar el que los estafilococos formen cápsulas.

En conclusión, la patogenicidad de los estafilococos depende de su capacidad de producir toxinas y de colorear los tejidos. En ciertas infecciones generalizadas la exotoxina es responsable de las manifestaciones clínicas de toxemia y posiblemente contribuye a la muerte del individuo. El envenenamiento por alimentos debido a los estafilococos se debe a la ingestión de enterotoxina preformada en los alimen-

tos ingeridos. Sin embargo en la mayoría de las infecciones por estafilococos, el factor predominante es la invasión de los tejidos y la producción de lesiones localizadas, gracias a la acción necronizante de la exotoxina y a la destrucción de los leucocitos por la leucocidina. Finalmente la capacidad de los estafilococos para causar infección está condicionada por la susceptibilidad relativa del huésped y su mecanismo de defensa.

LOS NEUMOCOCOS

Son cocos Gram positivos, frecuentemente de forma lanceolada y usualmente agrupados en pares o en cadenas cortas. Poseen una cápsula fácilmente desestable. Son pérmenes no móviles y que no forman esporas. Son lisados fácilmente por sales biliares. Son clasificados en tipos basándose en las diferencias químicas e inmunológicas de los grandemente polimerizados, polisacáridos que componen la cápsula.

Son habitantes normales de las vías respiratorias altas del hombre y de ciertos animales y causan fundamentalmente infecciones de las vías respiratorias y de las estructuras adyacentes; especialmente neumonía, sinusitis, otitis, conjuntivitis y meningitis.

En la actualidad es ampliamente aceptado que la producción de los polisacáridos capsulares son esenciales en la patogenicidad de los neumococos y que los anticuerpos que protegen al hombre o a los animales contra la infección están orientados hacia el material capsular.

Numerosas de las características biológicas de los neumococos son similares a aquellos de las diferentes especies de estreptococos, especialmente de los del grupo viridans. Las características más importantes que diferencian a los neumococos de los estreptococos viridans son: la predilección de los neumococos para producir neumonías; que son disueltos por las sales biliares, y que son muy virulentos para los animales del laboratorio en el aislamiento primario.

MORFOLOGIA Y REQUERIMIENTOS NUTRITIVOS

En el esputo, en el pus y en los pulmones de pacientes con neumonía, los neumococos se encuentran aislados, en pares o en cadenas cortas de cocos ovales o lanceolados. Cuando se encuentran en pares los extremos adyacentes de los cocos están generalmente redondeados con los extremos distales más aguzados. Su apariencia en medios de cultivo es semejante a la descrita, exceptuando que las cadenas de cocos son más cortas, especialmente en cultivos jóvenes. Durante las fases activas de crecimiento, los neumococos son Gram positivos, pero con el envejecimiento del cultivo aparecen células Gram negativas en número progresivo hasta transformarse todas las cepas en Gram negativas.

El fenómeno de la solubilidad en bilis o sales biliares, tales como el desoxicolato el taurocolato de sodio se debe a la activación de las enzimas autolíticas de los neumococos por estas substancias.

En gelosa sangre, a 37°C. los neumococos son alfa-hemolíticos, mostrando el color característico verde-café.

Aunque se han descrito medios sintéticos para cultivar neumococos tales como el de Roe y Adams (35), para el cultivo de los neumococos es preferible usar medios complejos tales como caldo infusión de carne con peptona a la cual se le añade sangre. Los neumococos no contienen catalasa ni peroxidasa. La temperatura óptima de crecimiento de los neumococos es alrededor de 37°C. Mueren rápidamente cuando se calientan a 55°C. o más.

Badger (36) describe los requerimientos nutritivos esenciales de los neumococos e indican otros que aumentan la velocidad de crecimiento. Según este autor la etanolamina hace que los neumococos crezcan formando grandes cadenas.

IDENTIFICACION

Los estreptococos del grupo viridans son las únicas bacterias que comunmente pueden confundirse con los neumococos. La diferenciación se hace basándose en la solubilidad en bilis de los gérmenes. Esta

prueba es de mucho valor; pues prácticamente todas las cepas de neumococos son solubles en bilis. La fermentación de inulina es dada generalmente como una prueba para distinguir neumococos de estreptococos basándose en que la fermentación de inulina es una propiedad característica de los neumococos; sin embargo la prueba aislada no tiene valor pues ciertos estreptococos, particularmente los del grupo *Salivarius* también la fermenta.

Otra propiedad que se usa para identificar neumococos es su virulencia para los ratones. Los estreptococos del grupo *viridans* no son virulentos para los ratones, mientras que la mayor parte de las cepas de neumococos (exceptuando algunos tipos, entre ellos el tipo XIV), son muy virulentos desde el aislamiento primario.

DISTRIBUCION

Los neumococos son habitantes normales de la nasofaringe del hombre no importando el clima en que viva. En todas partes del mundo los tipos I y II son los más importantes en la producción de enfermedades, aunque son otros los tipos que más frecuentemente se encuentran en los portadores sanos. Entre los animales; sólo se encuentran portadores comúnmente en los monos, lo cual no tiene importancia desde el punto de vista epidemiológico. Ocurren frecuentes epizootias de neumococos tipo XIX en los cuyes.

PATOGENICIDAD

La infección en el hombre puede ser causada por cualquiera de más de 75 Tipos serológicos de neumococos; sin embargo sólo unos cuantos tipos producen el mayor por ciento de las enfermedades. Así vemos que los tipos I y II juntos causan aproximadamente la mitad de los casos de pulmonía lobar en los adultos de todas partes del mundo. En los niños de menos de 12 años los Tipos que más frecuentemente causan pulmonía son en orden de frecuencia el XIV, el I y el VI.

Entre los animales del laboratorio el ratón es el más susceptible, aunque también lo son las ratas y los conejos. La inoculación intraperitoneal en el ratón causa su muerte en menos de 48 horas.

MÉTODOS Y TÉCNICAS PARA EL AISLAMIENTO DE LOS COCOS GRAM POSITIVOS

Al producir estados patológicos las diversas especies de cocos Gram positivos patógenos, son susceptibles de ser encontrados en la sangre, en las vías respiratorias y en el esputo, en los aparatos génito-urinarios y en la orina, en las heces fecales, en los tegumentos externos, en el pus formado al producir lesiones locales de cualquier parte del organismo humano y en el líquido céfalo-raquídeo.

Examinaremos segmentariamente el aislamiento de los cocos Gram positivos según los aparatos, fluidos humanos o excretas de donde se pueden aislar, a la vez que se señalará el proceso para identificarlos y diferenciarlos de otros cocos Gram positivos no patógenos.

HEMOCULTIVOS

Ya que entre los cocos Gram positivos patógenos susceptibles de aislarse por hemocultivos, los hay aerobios, microaerófilos y francamente anaerobios, es preciso usar medios de cultivo adecuados.

El medio de elección es el recomendado por Foley y Schawb (37) el cual es llamado por los laboratorios Difco (24) "medio fluido de tioglicolato". Según estos autores, este medio debe usarse de preferencia a cualquier otro para practicar hemocultivos particularmente en el caso de las endocarditis por estreptococos y para los estreptococos anaerobios y microaerófilos como los que producen sinusitis o infecciones del útero. Este medio por sí mismo neutraliza la sulfonamidas por lo cual no parece necesario añadirle ácido para-amino-

benzoico, aunque puede añadirse este antagonista en concentración de 0.5 a 5 mgms. por 100 c.c. del medio (38) lo mismo es conveniente añadir penicilinas para neutralizar la penicilina que pueda estar presente en la sangre. (39)

La técnica siguiente es la que se recomienda:

- 1.—Limpieza de la piel con alcohol yodado (yodo metaloide: 5 gms. yoduro de potasio: 10 gms. alcohol de 70°: 100 c.c.).
- 2.—Extracción de 10 c.c. de sangre con aguja y jeringa esterilizadas en autoclave con la técnica usual.
- 3.—Añadir 5 c.c. de esta sangre antes de que se coagule a un tubo que contenga 15 c.c. de tioglicolato fluido.
- 4.—Añadir los 5 c.c. de sangre restantes en la jeringa a un tubo que contenga 5 gotas de heparina al 1% o bien 2 c.c. de citrato de sodio al 2% (40). Este tubo deberá remitirse rápidamente al laboratorio para ser sembrada la sangre o conservada en el refrigerador.
- 5.—En el laboratorio se tendrán tubos de gelosa para anaerobiosis (anaerobio agar B. B. L.) y base de gelosa sangre (Blood-Agar base Difco) entubada estéril, en cantidades de 20 c.c. y conservados en baño María a 50° C. A cada uno de estos tubos se añadirá 1 c.c. de la sangre con anticoagulante. El tubo conteniendo gelosa para anaerobiosis se vierte en una caja de Petri y al estar solidificado el medio, se cambia la tapa standar por una tapa de tipo Brewer (4). El tubo conteniendo la gelosa sangre hecha con el medio de Difco se pone en una caja de Petri común.
- 6.—A las 24 y 48 horas se examinan las cajas de Petri buscando tanto colonias superficiales como profundas y en el caso de haberlas, se resiembran en cajas Petri con gelosa para anaerobiosis cubiertas con tapas tipo Brewer con el objeto de tener abundantes cultivos para identificar el germen. Si la caja con base de gelosa sangre muestra colonias superficiales que

re decir que los gérmenes soportan el oxígeno y las colonias pueden sembrarse libremente en la superficie de gelosa sangre.

7.—Del tubo conteniendo tioglicolato fluido se siembra 1 c.c. en una caja con 20 c.c. de gelosa para anaerobiosis cubierta con tapas tipo Brewer y la superficie de 1 tubo de gelosa sangre. Esto debe hacerse diariamente procurando tomar el medio tanto en la superficie como del fondo para hacer las rasiembras.

8.—El hemocultivo no debe reportarse como negativo sino hasta 15 días después de haber sido tomada la sangre.

Mac Meal y Blevins (41) opinan que para tener éxito en el aislamiento de gérmenes de la sangre deben practicarse por lo menos tres hemocultivos en días sucesivos y preferentemente a diferentes horas del día. Estos autores reportan 36 hemocultivos positivos y de estos se aislaron los siguientes gérmenes:

Estreptococos salivarius	13	cepas
Estreptococos equinus	7	„
Estreptococos faecalis	6	„
Estreptococos bovis	3	„
Estreptococos viridans	2	„
Neumococos de Tipo no especificado .	2	„
Estafilococos aureus	1	„
Actinomyces	1	„
Bacilos gram negativos de especie no determinada	1	„

UROCULTIVOS Y CULTIVOS DEL TRACTO UROGENITAL

Las infecciones del aparato génito-urinario constituyen un gran porcentaje de las muestras enviadas al laboratorio.

La recolección de las muestras es a veces difícil debido a la oposición de los pacientes. Sin embargo, pueden recogerse muestras razonablemente útiles de orina en el hombre haciendo que orine en dos partes; desechando la primera y usando la segunda parte para los cultivos. Sin embargo en general el cateterismo debe ser usado, y recomendado como indispensable en la mujer.

Los genitales externos deben ser cuidadosamente desinfectados con solución de mertiolato, particularmente en las mujeres, y las muestras de orina recogidas en tubos estériles deben examinarse para ver si tienen flóculos de moco o pus los cuales deben recogerse con pipeta o con asa estériles, pues con frecuencia dan cultivos más puros de gérmenes patógenos que los que dan los cultivos de muestras generales. Además, nunca deben descuidarse centrifugar una porción de orina recogida en forma estéril para hacer una coloración de Gram y estudiar una gota del sedimento para ver si son gérmenes móviles o no.

Para el aislamiento de los cocos Gram positivos patógenos de la orina hay que inocular caldo de tioglicolato. La superficie de una placa de gelosa sangre y una caja con gelosa para anaerobiosis a la que se le debe de añadir 1 c.c. de sangre citratada y la cual deberá taparse al solidificarse el medio con tapa tipo Brewer. A las 24 a 48 horas deberá sembrarse del tubo de caldo de tioglicolato, la superficie de una caja de gelosa sangre y una caja de gelosa para anaerobiosis tam-

bién adicionada de 1 c.c. de sangre citratada y tapada con tapa tipo Brewer.

Las secreciones uretrales del hombre y mujer se deben recoger con dos hisopos estériles; uno para el frotis y otro para el cultivo. Debe hacerse una siembra en la superficie de gelosa sangre, inocularse un tubo de tioglicolat fluido y una caja de gelosa para anaerobiosis adicionada con 1 c.c. de sangre citratada.

La secreción prostática debe recogerse en forma especial en un tubo o en una caja de Petri estériles. El meato uretral debe limpiarse cuidadosamente y debe encargarse al paciente que exprima su uretra en el curso del masaje prostático con el fin de obtener la mayor cantidad posible de material, el cual debe ser sembrado para cultivar aerobios y anaerobios.

La recolección de secreciones del cuello de la matriz debe hacerse a través de un espejo vaginal. Después de extraer el tapón mucoso, el cuello se limpia con hisopos estériles y entonces usando nuevos hisopos estériles se les hace rotar dentro del cuello suavemente; uno de estos hisopos se usa para hacer frotis y otro para los cultivos recomendados en aerobiosis y anaerobiosis.

BILICULTIVOS

A los cocos Gram positivos aislados de la bilis por drenaje de ella con sonda duodenal, no puede atribuirseles un papel patógeno en las vías biliares pues pueden haber sido arrastrados de la zona de la faringe al duodeno. Cuando gérmenes de este tipo han sido cultivados de la bilis extraída en el curso de una operación de las vías biliares, el papel patógeno que puedan desempeñar si es de considerarse.

Las muestras de la bilis deben sembrarse en gelosa sangre, en gelosa para anaerobiosis añadida de sangre y en caldo de tioglicolato con el objeto de tener medios adecuados para el crecimiento de los cocos aerobios, y microaerofílicos y anaerobios.

CULTIVOS DE LIQUIDO CEFALO RAQUIDEO

El producto debe recogerse con precauciones de esterilidad y deberá enviarse al laboratorio rápidamente con el fin de que llegue si es posible antes de que la coagulación pueda ocurrir.

Entre los cocos Gram positivos que causan meningitis, se encuentran los neumococos; los estafilococos y estreptococos rara vez la causan.

El líquido céfalo-raquídeo deberá sembrarse en los tres medios recomendados y no deberá descuidarse de hacer frotis con el sedimento o con el coágulo formado.

EXUDADO DE LOS OJOS Y OIDOS

La mayoría de los gérmenes piógenos pueden causar conjuntivitis; entre estos gérmenes se encuentran los estreptococos, estafilococos y neumococos. Debe recogerse el producto con hisopos estériles de la conjuntiva, y después de oprimir el saco lacrimal. La siembra deberá de hacerse en gelosa sangre, gelosa para anaerobiosis y en caldo de tioglicolato; no deberán de omitirse los frotis.

Las infecciones de los oídos en las otitis medias agudas y subagudas y crónicas usualmente son debidas a gérmenes piogénicos. Se debe proceder a estudiar los productos como se aconsejó en las conjuntivitis.

EXUDADOS DE FARINGE, NARIZ Y SENOS PARANASALES

En las secreciones nasales pueden encontrarse cualesquiera de los gérmenes patógenos de las vías respiratorias. En los niños, el producto tomados con hisopos de la nariz debe usarse en lugar del esputo

para hacer frotis y cultivos con lo cual se puede obtener una idea justa del germen causante de una neumonía.

La incidencia de *Streptococcus piógenes* en la nariz y fauces en las personas sanas es muy variable.

Los senos paranasales son estériles en personas sanas; en enfermedad la flora de los senos puede ser muy variable y se puede encontrar prácticamente cualquier bacteria. La infección de los senos maxilares puede ocurrir como secuela de abscesos dentarios apicales y en tales casos pueden encontrarse diferentes tipos de gérmenes anerobios.

Se acostumbra tomar productos de fauces y amígdalas en las amigdalitis agudas, las cuales en la mayoría de los casos contienen *Streptococcus piógenes*.

Nunca debe descuidarse el examinar frotis teñidos por el método de Gram al recoger cualquier producto para ser cultivados, así como tampoco después del cultivo.

Rammelkamp y Dingle (20) recuerda que es un hecho de observación, que entre más cultivos de faringe se hacen en una población dada más portadores se encuentran de los estreptococos de los diversos grupos serológicos de Lancefield. En esto influye el método empleado en la toma de las secreciones, del número de estreptococos existentes en el momento en que se hace la toma y también de la clase de medio de cultivo y en el tipo de sangre empleados en dicho medio de cultivo. Estos autores también recuerdan que los estreptococos patógenos crecen mejor en medios ricos, ya que sus requerimientos nutritivos son complejos y que no hay un método enteramente satisfactorio para su aislamiento e identificación preliminar.

Siendo tan variada y abundante la flora de la rinofaringe, es necesario usar un método que incluya diversos medios de cultivo para aislar los diversos cocos Gram positivos estudiados en esta tesis. Se recomienda seguir los siguientes pasos:

- 1.--Obtener el producto por medio de hisopos estériles.
- 2.--Colocar uno de estos hisopos en medio de Pike (42) en el que se deja unas 18 horas, resambrando después en la su

perficie de una placa de gelosa sangre y en placa mezclada de gelosa sangre.

3. — Con un segundo hisopo siémbrese en placas mezcladas con gelosa mitis salivarius (24) a la cual se le ha añadido 0.20 c.c. de una solución, al 5% de telurito de potasio por litro y medio. Incúbese la placa por 24 horas a 37°C. En este medio de cultivo ideado por Chapmann (24) puede sembrarse en la superficie de la placa, pero se recomienda se haga una dilución decimal del producto y se siembre sólo 0.01 c.c. de esta dilución. Los *S. mitis* producen pequeñas colonias azules. Los *S. salivarius* producen colonias también azules, de tipo, liso o áspero gomoso de uno a cinco mm. de diámetro, dependiendo del número, de colonias por placa. Los enterococos forman colonias azules y negruzcas, brillantes, ligeramente realzadas y de 1 a 2 mm. de diámetro que pueden fácilmente diferenciarse de las de otros estreptococos con luz reflejada. Los escasos coliformes que logran crecer forman colonias café, algunos estafilococos también logran crecer en este medio.

Chapman (43) describe también otro medio para aislar estreptococos de materiales con gran diversidad de gérmenes al que puede llamarse gelosa sangre con azida de sodio y violeta de genciana pero el cual no recomendamos, por ser de difícil preparación. En términos generales el medio de Pike permite el crecimiento selectivo, de los estreptococos no hemolíticos y el de Chapmann conteniendo telurito de potasio inhibe casi totalmente las bacterias Gram negativas.

4. — Con un tercer hisopo háganse placas mezcladas siguiendo el siguiente procedimiento que tiene la ventaja de permitir el crecimiento tanto de cocos aerobios como anaerobios y de permitir ver la producción de hemólisis en aquellas cepas de treseptococos que sólo la producen en anaerobiosis. Póngase en cajas de Petri, 10 c.c. de base de gelosa sangre "Difco" estéril y déjese solidificar, estas cajas pueden almacenarse en el refrigerador. Inocúlese el borde de una de estas placas

con el hisopo que contienen el material y con una asa estéril extiéndase el material sembrado por el resto de la placa. Añádase 5 c.c. de gelosa fundida a 45°C. conteniendo 0.5 c.c. de sangre. Incúbese a 37°C. por 48 horas y refrigérese por 24 horas más haciendo observaciones diarias.

Con este método, se pueden obtener colonias bien aisladas y muestran buenas zonas de hemólisis, incluyendo las dobles zonas de hemólisis típicas de los estreptococos hemolíticos del grupo serológico B de Lancefield (40).

ESPUTOS Y SECRECIONES BRONQUIALES EXUDADOS DE CAVIDADES SEROSAS

La investigación de cocos Gram positivos en estos productos rar vez se practican en el laboratorio, pues la presencia de estos gérmenes en el esputo y secreciones bronquiales no significan que sean agentes causales de enfermedad; este mismo tipo de gérmenes rara vez infecta las cavidades serosas.

MATERIAL DE HERIDAS

Este capítulo cubre una gran variedad de muestras y de organismos infectantes. En ocasiones los exudados son en pequeña cantidad y sólo pueden recogerse con hisopos estériles o en asa de platino. Si existe bastante pus o líquido seroso, debe de tomarse una muestra abundante, pero es necesario recordar que el raspado de las paredes de los abscesos o de las fístulas, dan muestras más representativas de los gérmenes patógenos que el pus que se encuentra en las cavidades. La selección cuidadosa de las muestras que deben estudiarse es muy importante, y la consulta con el bacteriólogo durante la exploración clínica no sólo es valiosa en este respecto, sino que estimula su interés en el caso.

Cualquier material recogido de heridas debe sembrarse en placas de gelosa sangre para anaerobiosis. Nunca debe omitirse el examen de un frotis del producto, teñido con Gram.

Como siempre el laboratorio deberá ser informado del origen del material y particularmente de la sospecha clínica de cual puede ser el agente causal.

COPROCULTIVOS

Sólo tiene aplicación el coprocultivo en lo que se refiere a cocos Gram positivos, en el aislamiento de estafilococos en las ocasiones en que se sospeche que estos gérmenes sean el agente causal de intoxicaciones alimenticias.

Chapmann (23) basándose en el hallazgo de Kock de que los estafilococos son los únicos cocos Gram positivos capaces de crecer en gelosa que contenga 7.5% de NaCl' recomienda aplicar este conocimiento al problema de aislar y diferenciar los estafilococos.

El autor añade 7.5% de cloruro de sodio a gelosa manitol con rojo de fenol (este medio de cultivo se conoce ahora con el nombre de "Mannitol Salt Agar" Difco). Este medio de cultivo debe esterilizarse y luego sembrarse con el material en el que se investigan los estafilococos. Después de incubar este medio a 37°C durante 36 horas casi todos los organismos que crecen abundantemente son estafilococos rodeadas por zonas amarillentas; por el contrario, los estafilococos no patógenos forman pequeñas colonias rodeadas por zonas rojas o púrpuras, en este medio de cultivo.

Otros medios de cultivo se han recomendado para el aislamiento de estafilococos patógenos de las heces (29, 44, 45). Sin embargo, al hacer bacteriología clínica, basta con emplear los medios de la casa Difco llamados "Staphylococcus eMdium No. 110" y "Chapman Sótne Medium", los cuales ya fueron mencionados en páginas anteriores.

Métodos y Técnicas empleados para aislar, clasificar y determinar la patogenicidad de los gérmenes estudiados en este trabajo y Procedimientos inmunológicos que señalan la infección por cocos Gram Positivos en el ser humano.

El propósito de este capítulo, es describir exclusivamente aquellos procedimientos que no están ampliamente definidos y que sin embargo, son necesarios en un laboratorio bacteriológico.

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE LA COAGULASA POR LOS ESTAFILOCOCOS

Tec. 1.—Un cultivo de 18 horas desarrollado en "Manitol Salt Agar" Difco se emulsifica en caldo de triptosa fosfato "Difco" en 2 tubos; a uno de estos se añade una cantidad igual de sangre humana entera citratada G y a otro tubo se le pone plasma humano citratado. Los tubos se agitan y se colocan en la incubadora, la sangre completa empieza a ser coagulada alrededor de los 80 minutos y el plasma puro en 100 minutos. Los coágulos se hacen firmes en 3 o 4 horas; algunas cepas de estafilococos no coagulan la sangre entera y sí el plasma puro o viceversa por lo cual hay que correr simultáneamente la prueba en las dos formas durante 3 horas en la incubadora y después 24 horas a la temperatura ambiente (29).

Tec. 2.—Se hace crecer la cepa en el medio de cultivo "Staphylococcus Medium No. 110" o en el "Chapman Stone Medium". Se incuba a 37°C. y tan pronto como exista suficiente crecimiento se inicia la prueba. Si la prueba no va a ejecutarse inmediatamente guardar la placa en el refrigerador.

Se hace una emulsión del crecimiento en 0.3 de infusión de cerebro y corazón "Difco", y se añade 0.3 c.c. de sangre humana completa de la que se conozca que es coagulada rápidamente por una cepa de estafilococos que tenga bajo poder coagulante. (31).

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE CATALASA (46)

A un cultivo de 24 horas en gelosa inclinada e incubado a 37°C., añádase 1 c.c. de H₂O₂ (10 volúmenes) sobre la superficie de crecimiento y colóquese el tubo en posición inclinada. Si se forman burbujas de gas la reacción es positiva; si no se forma gas, la reacción es negativa.

ESTUDIO DE LA PRODUCCION DEL PIGMENTO POR LOS ESTAFILOCOCOS

Debe hacerse el cultivo en gelosa que contenga glucosa y en aerobiosis. Con otros hidrocarbonados o no se produce pigmento o la producción es muy débil. Los STAPHILOCOCCUS albus no producen pigmento con ningún hidrocarbonado. La incubación debe hacerse por 48 horas a 37°C. y luego 24 horas a la temperatura ambiente.

LISIS DE LOS NEUMOCOCOS POR LAS SALES BILIARES

Tec. 1.—Si el germen ha crecido en medio líquido, debe separarse del medio de cultivo por centrifugación, especialmente si dicho medio de cultivo contiene sangre u otros materiales proteínicos.

El germen debe ponerse en suspensión en solución salina isotónica, que tenga un pH aproximadamente neutro, aunque éste puede fluctuar entre pH 6.5 y 8.0.

Los neumococos se lizan rápidamente a 37°C. en 30 minutos al añadir igual volumen de bilis al 10% o una solución de desoxicolato de Na. al 10%.

Como control se debe poner una suspensión de los mismos organismos con un volumen igual de suero fisiológico en lugar de bilis (2).

Tec. 2.—La diferenciación de neumococos, de estreptococos hemolíticos es prácticamente imposible basándose en la pura morfología. El procedimiento de diferenciación de Nenfeld usando sueros específicos es laborioso. El procedimiento descubierto también por

Nensfeld de que el neumococo es soluble en bilis es el de elección. Los autores describen el siguiente método usando sales biliares para disolver el neumococo.

Técnica.—A 4 gotas de desoxicolato de sodio al 10% puestas en una lámina, añádanse una pequeña cantidad del medio a estudiar (esputo lavado, caldo con suspensión del organismo o colonias crecidas en gelosa). Déjese la lámina reposar 10' y agítese suavemente de tiempo en tiempo.

En otra lámina hágase un frotis con el mismo producto para usar como control.

Del producto de la primera lámina la que contiene desoxilato de sodio hágase un frotis también, tiñase ambas láminas con Gram, la presencia de organismos encapsulados Gram negativos tanto en la lámina testigo como en la que contiene el germen con desoxicolato de sodio indican que los organismos no son neumococos.

Con todas las técnicas, a veces ocurre que solo hay lisis parcial del neumococo (48).

Medio de Enriquecimiento de Pike para los Estreptococos Hemolíticos (42).

La base del medio es caldo de infusión de corazón de buey conteniendo:

1% de triptosa.

0.02% de glucosa.

5% de sangre de conejo.

Se entuba en cantidades de 2 c.c.

El día en que el medio va a ser usado se añade a cada tubo 0.15 c.c. de una solución estéril al autoclave, de azida de sodio al 1:1.000, y 0.1 c.c. de una solución también estéril al autoclave de cristal violeta al 1: 25.000.

El medio empieza a perder sus propiedades inhibitorias para los

estafilococos y bacterias Gram negativas, dos días después de haber añadido al azida de sodio (NaN_3).

En los tubos que contienen este medio de enriquecimiento se dejan los hisopos con que se tomó el producto de la faringe, entre 12 y 24 horas y se hacen resiembras con asa de platino recta en gelosa sangre (aerobiosis y anaerobiosis).

DETERMINACION DEL TITULO DE ANTIESTREPTOLISINAS EN EL SUERO SANGUINEO (49).

La determinación del título de antiestreptolisina en el suero humano es de valor en el estudio de la infección por estreptococos hemolíticos y otros padecimientos relacionados con ellos, tales como la fiebre reumática. Su uso fué limitado por ciertas dificultades técnicas inherentes al método más ampliamente usado, el cual fué descrito por Coburn-Pauli.

La estreptolisina o hemolisina del estreptococo es inestable y rápidamente oxidada, transformándose en una substancia antigénicamente potente, la cual no es capaz de hemolizar los eritrocitos. Las técnicas previas mantenían la lisina para las pruebas en estado activo reduciéndola con hidrosulfito de sodio, después de quitarle el oxígeno en una bomba de vacío, y almacenándola bajo aceite en un lugar frío. Este procedimiento es molesto y la lisina se deteriora rápidamente aún bajo las circunstancias más favorables. Además, era difícil producir regularmente lisina de potencia adecuada, debido a variaciones en los medios de cultivo disponibles, lo mismo que a otros factores.

La estreptolisina, en el estado de oxidación, es estable y su potencia hemolítica no varía, aunque se almacene por varios meses en el refrigerador o durante relativamente largos períodos de tiempo a la temperatura ambiente antes de su reducción. También puede ser fácilmente concentrada y parcialmente purificada.

Estos hechos han sugerido una modificación del método para la

determinación del título de antiestreptolisinas del suero, el cual ha probado ser extremadamente satisfactorio en los usos de rutina y da casi siempre valores semejantes. Está basado en la preparación de una antiestreptolisina concentrada, la cual se almacena en estado de oxidación y que se reduce al estado activo en el momento de la prueba.

Preparación de la lisina.

Una cepa del grupo "A" de estreptococos hemolíticos (La cepa Richards fué usada por los autores, y fué proporcionada, por la Doctora Rebecca C. Lanefield, junto con un suero de título de antiestreptolisina conocido) capaz de producir grandes cantidades de hemolisina, se hace crecer 18 horas en caldo infusión de carne (Meat infusión broth), que contenga 0.2% de dextrosa, 2% de proteosa peptona (Difco), neutralizándola con la adición de 0.2% de bicarbonato de sosa estéril. La inoculación original debe ser de un volumen grande, para obtener un crecimiento rápido del organismo en este medio líquido.

Después de la incubación, el estreptococo, es separado en una centrifuga, de las cuales las centrifugas en ángulo de gran velocidad son el tipo más satisfactorio, si se preparan grandes volúmenes. La lisina debe entonces ser esterilizada por filtración a través de un filtro Zeitz y usada en la prueba, pero como el volumen es grande, y la actividad hemolítica puede ser insuficiente, es muy conveniente concentrarla y purificar parcialmente el material.

El cultivo clarificado es llevado a 0.5% de saturación por la adición de 429 grs. por litro, de sulfato de amonio a 20 C. El precipitado resultante es separado por centrifugación, y disuelto en un buffer de fosfatos al pH de 7.0 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 14.2 grs; KH_2PO_4 : 3.63 grs. por litro de agua destilada). El volumen final debe ser aproximadamente el 4% del volumen del cultivo original. Esta solución café viscosa se coloca en un saco de celofán y se dializa por 18 horas en agua corriente de la llave; este paso se asocia con un considerable aumento en el volumen.

Nueve gramos de cloruro de sodio se añaden a cada litro del material dializado, el cual entonces se esteriliza a través de un filtro

Zeit. Después de ponerla asépticamente en tubos estériles, la estreptolisina está lista para ser usada.

Determinación de las unidades de combinación.

La determinación de las propiedades antigénicas y de combinación de la lisina concentrada requiere su reducción al momento de ser usada. Esto se logra mezclándola con un agente reductor activo, preparado de la siguiente manera:

1.6 grs. de hidróxido de sodio se añaden a 1 litro de un buffer isotónico de un pH de 6.5, que se prepara de la siguiente manera:

Na Cl	4,2	grs.
KH ₂ PO ₄	3,17	grs.
Na ₂ HPO ₄ 12H ₂ O	3,58	grs.

Por litro de agua destilada.

Al tiempo de hacer la prueba 0.15 grs. de hidrocloreto de cisteína (Cysteine hydrochloride) se disuelven en 25 c.c. de este buffer, alcalino para hacer una solución m—25 de este agente activo.

Para determinar las unidades de combinación, la lisina concentrada se diluye en serie de 1: 2 a 1: 12.—Muestras de cada dilución son entonces puestas en pequeños tubos de acuerdo con la siguiente tabla:

cc de lisina diluida.	0.35	0.30	0.25	0.20	0.15	0.10
cc de cisteína neutra.	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40

Se permite proceder a la reducción durante 10 minutos y entonces se añade 1 c.c. de una dilución de estreptolisina standar, conteniendo una unidad por c.c. a cada tubo, se mezcla cuidadosamente y se incuba durante 15 minutos al baño María. Al final de este tiempo, se añaden 0.5 c.c. de una suspensión al 5% de eritrocitos de conejo lavados 3 veces, a cada tubo. Es desable lavar y suspender las células en el buffer isotónico de pH 6,5 sin añadirle el hidróxido de sodio. Después de una posterior incubación por 45 minutos los tubos se retiran del agua y se centrifugan. La mínima cantidad de lisina que

exactamente haya producido hemólisis, es la unidad de combinación. Y es usualmente 0.15 c.c. de la dilución al 1:8 del material concentrado.

Determinación del título de antiestreptolisina.

El título de antiestreptolisina del suero puede ser determinado por el método descrito por Coburn y Pauli, usando la lisina recientemente reducida. Para hacer esto, la lisina concentrada es primero diluida al grado determinado como el apropiado, por las pruebas previas con Buffer isotónico. La lisina concentrada se diluye en la solución neutra de cisteína en el momento de ser usada, de tal manera que las unidades de combinación queden contenidas en un volumen final de 0.5 c.c. Así, si una lisina concentrada debe ser diluida al 1:8, 15 c.c. de esta lisina deben añadirse a 35 c.c. de la solución reductora. La lisina queda lista para usarse después de 10 minutos de estar expuesta al agente reductor, y no se deteriora dentro de los 60 minutos después de su preparación.

La lisina preparada de esta manera, puede ser usada con las técnicas usuales, pero se ha encontrado más conveniente eliminar el procedimiento de 2 pasos descrito por Coburn y Pauli, y por Hodge y Swift, y determinar el título de antiestreptolisina de cada suero en una misma operación, por medio de una simplificación de un procedimiento original sugerido por Hodge y Swift, el cual parece no haber sido ampliamente usado. Esto puede conseguirse preparando diluciones iniciales de suero en Buffer isotónico al 1:10, 1:100 y 1:500, estudiando cada una de las muestras de suero diluido de acuerdo con el siguiente esquema:

Dilución del suero.

c.c. de suero diluido	1:10		1:100					1:500				
	0.8	0.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.3	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2
c.c. de buffer isotónico	0.2	0.8	0.3	0.2	0.4	0.6	0.7	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8
c.c. de lisina reducida	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Valor unidad de cada tubo.	12	50	100	125	166	250	335	500	625	833	1250	2500

Después de 15 minutos de incubación a 37°C. en baño maría, 0.15 c.c. de la previamente descrita suspensión de eritrocitos de conejo se añaden a cada tubo y todos los tubos se mantienen a la misma temperatura por 45 minutos más. El último tubo en el cual la lisis no ha ocurrido indica el título de antiestreptolisina del suero. Un suero control de título de anticuerpos conocidos, siempre debe ser incluido para checar la potencia de la lisina.

La técnica modificada para la determinación del título de la antiestreptolisina, descrita antes, y basada en la reducción de la lisina standar concentrada, en el momento de ser usada, tiene ciertas ventajas sobre los métodos anteriormente usados.

La lisina almacenada en el refrigerador, y el agente reductor en forma seca, permanecen estables por muy largos períodos de tiempo y están listos para ser usados inmediatamente en cualquier momento. La técnica complicada que exige quitar el oxígeno disuelto con una bomba de vacío de la lisina, y almacenarla bajo aceite, lo mismo que el riesgo de una prematura oxidación de la lisina antes de usarse, hacen más cómoda y exacta la técnica aquí descrita. Además, la presencia del agente reductor en cantidades adecuadas durante la prueba garantizan que el agente lítico permanecerá activo durante el intervalo requerido para la consumación del procedimiento.

La concentración de la lisina, aunque no es especial, da un producto de adecuada potencia, hace la esterilización por filtración más sencilla y disminuye el volumen para ser almacenado y remitido al lugar donde se necesite.

Otros investigadores han indicado que la lisina, después de ser reducida, debe ser envejecida para obtener un producto estable de máxima potencia. Estudios cuidadosos de la técnica descrita aquí, han demostrado que este no es el caso, y que el material queda listo para ser usado después de una exposición al agente reductor por 10 minutos.

La modificación sugerida en la cual el título de antiestreptolisina es determinado como una operación de un solo tiempo, reduce grandemente el tiempo de ejecución de las pruebas. Se usan mayores diluciones decrecientes de las usuales del suero problema, pero los

valores en unidades obtenidas son adecuados para cualquier propósito de investigación, excepto bajo circunstancias que comprendan el estudio de sueros de muy alto título de anticuerpos, en los cuales posteriores determinaciones con diferentes sistemas de dilución pueden ser ocasionalmente deseables.

Muchos sueros humanos y animales han sido estudiados con la técnica descrita, y los resultados han sido muy satisfactorios. Ciertos sueros usados como controles han sido repetidas veces titulados por diferentes técnicos, usando diferentes lotes de lisina, con errores siempre menores de los que pudieran esperarse como resultado de las diluciones que son necesarias. Ha sido también posible enviar lisina a otros laboratorios y establecer en ellos el método, con resultados comparables o semejantes.

CLASIFICACION SEROLOGICA DE LOS ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS

Como ya se dijo al tratar los estreptococos, sólo es factible a la fecha, clasificar serológicamente a los estreptococos beta hemolíticos.

Lancefield los ha clasificado en grupos y tipos, pero sólo es de utilidad clínica la clasificación en grupos.

Estos estreptococos beta-hemolíticos se han dividido en los siguientes grupos: A. B. C. D. E. F. G. H. K. L. y M.

El grupo A es el más importante ya que incluye a la mayoría de los estreptococos patógenos al hombre. Los estreptococos del grupo B se les encuentra produciendo comunmente mastitis en el ganado bovino. Dentro del grupo C hay algunos gérmenes que pueden causar enfermedad en el hombre, tal como el S. equi. Sin embargo, no solo los estreptococos de los grupos A y C pueden causar enfermedades en el hombre, sino también los miembros de otros grupos, como son el B. el D. y el G.

La determinación del grupo al que pertenecen los estreptococos se puede hacer con dos técnicas:

- 1.—Por precipitación (Lancefield).
- 2.—Por aglutinación en placa (Griffith).

Técnica de las reacciones de precipitación para determinar el grupo de los estreptococos hemolíticos.

Ante todo se requiere la preparación de un extracto bacteriano. Se recomiendan dos métodos para la preparación de este extracto: el

método del extracto ácido de Lancefield y el método de la formamida de Fuller. El procedimiento de Lancefield es más sencillo, pero requiere mayores volúmenes del caldo de cultivo. El método de Fuller es más complejo, pero con él se obtienen extractos más específicos. Los cultivos de los estreptococos pueden hacerse en cualquier caldo con el que se obtengan buenos crecimientos.

PREPARACION DEL EXTRACTO DE LANCEFIELD

Se centrifugan 50 c.c. del caldo en el cual se hicieron crecer durante 18 horas los estreptococos y se desecha el líquido sobrenadante. Los gérmenes se resuspenden en 2 c.c. de una solución HCl N/20 en suero fisiológico al 0.85%. La suspensión debe quedar lo suficientemente ácida como para dar un color rojo con indicador de azul de timol (prueba en placa). El tubo se sumerge en agua hirviendo durante 10 minutos, se enfría en agua de la llave y se centrifuga. El líquido sobrenadante se separa y se neutraliza al tornasol añadiendo con cuidado sosa en solución normal. El precipitado que resulte se desecha después de centrifugar y el fluido claro sobrenadante se usa en la prueba de precipitación.

PREPARACION DEL EXTRACTO DE FULLER

Se centrifugan 10 c.c. de un cultivo en caldo del estreptococo y el líquido sobrenadante se quita hasta donde es posible. Se añaden 0.2 c.c. de formamida al sedimento bacteriano. Se agita el tubo y se coloca en aceite caliente a 150°-160°C. durante 15 minutos. Puede usarse aceite mineral. El tubo se enfría y se añaden 0.5 c.c. de alcohol ácido (1 parte de HCl concentrado con 99 partes de alcohol de 95%). El precipitado que se forma contiene restos bacterianos y proteínas y se desecha después de centrifugación. El líquido sobrenadante se coloca en un tubo de ensaye pequeño y se añade 1 c.c. de acetona. Se agita el tubo y se centrifuga desechando el líquido sobrena-

dante. El precipitado de acetona es de muy pequeña cantidad, pero contiene prácticamente todo el antígeno de grupo. A este precipitado se añaden 2 c.c. de suero fisiológico al 0.85% y una gota de rojo de fenilo o de azul de bromotimol y se neutraliza con solución de carbonato de sodio al 1%. Este extracto se usa en la prueba de precipitación, siendo esencial sean perfectamente claros y de reacción neutra.

La reacción de precipitación.

Se recomienda el micrométodo de Lancefield debido a que requiere poca cantidad de suero y da resultados satisfactorios.

El micrométodo requiere del uso de tubos especiales, los cuales se preparan de la siguiente manera: Un tubo de unos 7 milímetros de diámetro se alarga ligeramente en el sorlete. El tubo alargado se corta en el centro de manera de hacer dos tubos, cada uno de ellos de unos 6 centímetros de largo. Los extremos angostos se insertan en la plastilina de los soportes, en tanto que el extremo de 7 milímetros de diámetro se conserva abierto para facilitar el pipeteo. El extremo inferior de este tubo queda con una luz de unos 3 milímetros de diámetro, pudiendo contener 0.1 c.c. de líquido en una columna de unos 8 a 10 milímetros de alto.

Se pipetean 5 centésimos de centímetro cúbico (0.05 c.c.) del extracto en los tubos y se añade con todo cuidado igual cantidad de los sueros standar a cada tubo. El suero no deberá mezclarse con el antígeno y los resultados se leen a los 30 minutos a la temperatura ambiente. Hay que hacer notar que incubando las pipetas a 37°C. una hora pueden obtenerse reacciones cruzadas. Una reacción positiva se presenta cuando aparece un anillo blanco de precipitado, el cual debe ser bien definido, y estar en el punto de unión del extracto y del suero. Para tener punto de comparación es importante poner un tubo control negativo, conteniendo solamente suero fisiológico y suero. También puede ayudar grandemente incluir controles positivos con extractos de organismos homólogos a los sueros que se usan.

La reacción debe ser clara, bien definida y ocurrir dentro de los 30 minutos de iniciada. Si no hay aparición de anillo blanquecino del tipo señalado y dentro del tiempo fijado, la cepa probablemente

no pertenece al grupo de ninguno de los sueros usados. Se recomienda sumergir los tubos en xilol inmediatamente antes de leer los resultados, pues esto aumenta la claridad de las reacciones.

TECNICA DE LAS REACCIONES DE AGLUTINACION PARA DETERMINAR EL GRUPO DE LOS ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS

La principal dificultad técnica en las pruebas de aglutinación con estreptococos es la tendencia de muchas cepas a aglutinarse. El uso del suero en concentraciones de 1% en el caldo donde crece el germen ayuda muchas veces, pero en ocasiones los estreptococos crecidos en un medio así se tornan no aglutinables. El añadir cantidades variables de glucosa al medio de cultivo puede dar también resultados satisfactorios. El hacer crecer los gérmenes a la temperatura ambiente algunas veces da suspensiones estables. Muy seguido no se requiere emplear ninguno de estos procedimientos.

Se centrifugan los cultivos de caldos y el sedimento se suspende en suero fisiológico al 0.85%, haciendo suspensiones densas de una densidad standar de aproximadamente veinte billones de microorganismos por c.c. añadiendo como preservativo 0.5% de fenol.

Las aglutinaciones se hacen a la temperatura ambiente en láminas excavadas de aproximadamente 1 cm. de diámetro. Con un asa de unos 2.5 m.m. de diámetro, se coloca el suero adelantado en la lámina y se añade una cantidad similar de la suspensión bacteriana. Se mezclan las dos gotas rotando la lámina y los resultados se leen contra un fondo oscuro usando buena luz; también deben leerse los resultados microscópicamente con objetivo de poco aumento. La lectura final se hace al cabo de un minuto. Deben usarse controles con sueros normales. La diferencia entre la aglutinación con el suero normal o con sueros heterólogos con la reacción encontrada con el suero homólogo debe examinarse dentro de los 30 segundos de iniciadas las reacciones. La reacción también debe compararse con las de una suspensión de estreptococos de tipo conocido con su suero homólogo.

COMPARACION DE LAS TECNICAS DE PRECIPITACION CON LAS DE AGLUTINACION PARA IDENTIFICAR EL GRUPO SEROLOGICO DE LOS ESTREPTOCOCOS

Ya se ha dicho antes, que en términos generales deben preferirse las técnicas de precipitación a la de aglutinación, pues con las técnicas de precipitación no tienen las dificultades técnicas que aparecen muchas veces al tratar de ejecutar la técnica de aglutinación, pues como ya también se dijo hay autoaglutinación de los estreptococos cuando las calorías son del tipo aspero (rough), además de que un buen número de cepas muestran reacciones cruzadas o bien no reaccionan con la técnica de aglutinación.

Sin embargo, aunque la relación del antígeno M con la inmunidad es específica, las técnicas de precipitación no siempre son capaces de identificar el grupo serológico de los estreptococos; así se ve que numerosas cepas del grupo A no pueden identificarse cuando los gérmenes han crecido a 37°C, pero sí pueden identificarse el grupo cuando el cultivo se ha desarrollado a 22°C; esto se debe a que a 37°C estas cepas producen una proteinasa que destruye la sustancia M, mientras que a menor temperatura esta enzima o no se produce o no activa.

Además la sustancia M se encuentra usualmente en los estreptococos del grupo A aislados de pacientes con infecciones estreptocócicas, pero las variantes "glosy" de estas cepas carecen de este antígeno, aunque pueden conservar la sustancia T. También se ha encontrado que cerca del 50% de las cepas aisladas en convalecientes muestran pérdida progresiva del antígeno M, el cual llega a desaparecer totalmente, en cambio, no se ha encontrado pérdida del antígeno T en estos estados.

Estas observaciones sugieren que al tratar de identificar el grupo serológico de los estreptococos en portadores y convalecientes particularmente, deben practicarse simultáneamente las dos técnicas, pues el antígeno en la reacción de precipitación es solo el antígeno M, en tanto que en la reacción de aglutinación, se busca no solo la presencia de antígeno M, sino también del antígeno T.

RESUMEN

1.—Un laboratorio de bacteriología clínica debe estar preparado para aislar los cocos Gram positivos tanto aerobios como microaerofílicos y anaerobios estrictos e identificar los gérmenes no sólo hasta el género, sino de ser posible hasta la especie.

2.—Los cocos Gram positivos patógenos para el hombre pertenecen a las familias V. Micrococcaceae y VII Lactobacteriaceae.

3.—En el género *Micrococcus* (Cohn) están incluidos los estafilococos y otros micrococos patógenos al hombre. En los géneros *Diplococcus* y *Streptococcus*, de la familia Lactobacteriaceae están incluidos los neumococos y estreptococos respectivamente.

4.—Es conveniente clasificar los estreptococos en dos grandes grupos:

a).—Especies aerobias y facultativamente anaerobias y

b).—Especies microaerofílicas y anaerobias estrictas.

Además, tanto para el laboratorio como para la clínica es conveniente tener presente que los estreptococos aerobios deben dividirse en cuatro grandes grupos:

a).—Grupo pirogénico o hemolítico.

b).—Grupo viridans.

c).—Grupo láctico o de gérmenes que agrían la leche.

d).—Grupo de los enterococos.

5.—Debe tenerse presente que el término de estreptococo hemolítico no indica por fuerza que el germen sea patógeno y por el contrario los gérmenes del grupo viridans y los enterococos pueden serlo. Actualmente se acepta, que el sistema de clasificación de los estreptococos basado en su acción sobre la sangre tiene poco valor, siendo más útil la clasificación de Lancefield en grupos inmunológicos aunque debe recordarse que la clasificación de Lancefield no es aplicable a las cepas no hemolíticas ni a las anaerobias.

6.—Muy presente debe tener el bacteriólogo que no es siempre posible identificar a los estreptococos desarrollados en los medios de cultivo basándose simplemente en su coloración al Gram, en su morfología y en la manera de agruparse. Así vemos que muchas cepas muestran las células con aspecto difteroide, otras más se decoloran muy fácilmente o se vuelven francamente Gram negativas en los medios de cultivo.

7.—Es necesario diferenciar perfectamente los estreptococos hemolíticos, viridans y enterococos, pues inclusive para la clínica esto es indispensable, ya que las infecciones por estreptococos hemolíticos habitualmente ceden fácilmente a la penicilina, en tanto que las causadas por los gérmenes del grupo viridans son de evolución prolongada aún bajo tratamientos intensos. Los enterococos son francamente penicilino resistentes.

8.—Los estreptococos hemolíticos patógenos para el hombre pertenecen fundamentalmente al grupo A de Lancefield. Se dan las técnicas para extraer el antígeno M de los estreptococos, lo cual permite clasificarlos serológicamente en grupo. La identificación de los estreptococos del grupo viridans se hace basándose en su acción alfa hemolítica en gelosa sangre y diferenciándolos de los neumococos por ser estos últimos solubles en bilis. Se dan también una serie de características biológicas que permite identificar y diferenciar a los enterococos de los otros estreptococos.

9.—La determinación seriada de la cantidad de estreptolisinas en un suero sanguíneo, permite afirmar, cuando la cantidad de uni-

dades aumenta en el curso del tiempo, que una enfermedad es de origen estreptocócico.

10.—Se acepta actualmente que los estafilococos pertenecen al género *Micrococcus* y que no es válido el género *Staphylococcus*. El término "estafilococo" se acepta para designar algunos micrococos patógenos, de acuerdo con la costumbre de designarlos así por muchos años.

11.—La identificación de los micrococos no debe hacerse basándose exclusivamente en ser Gram positivos y en su tipo agrupación sino que hay que recurrir a otras pruebas de tipo biológico.

12.—La mayor parte de las llamadas intoxicaciones por alimentos, son causadas por la enterotoxina de los estafilococos. La prueba más sencilla para diferenciar las cepas patógenas de las no patógenas se basa en la capacidad de las primeras para coagular la sangre y el plasma.

13.—Los neumococos están clasificados dentro del Género *Diplococcus*. La identificación del género debe hacerse no solo basándose en su morfología y manera de agruparse, sino también estudiando su solubilidad en bilis y estudiando su patogenicidad en ratones.

14.—Para el aislamiento primario de los cocos Gram positivos es conveniente que el laboratorio bacteriológico emplee medio fluido de tioglicolato, placas de gelosa sangre para sembrar en superficie, gelosa para anaerobiosis en cajas de Petri con tapas "Brewer" y hacer placas mezcladas de gelosa sangre. Estos medios de cultivo son necesarios pensando en que los cocos Gram positivos patógenos al hombre, no solo son aerobios sino también muchos de ellos son microaerófilos o anaerobios estrictos.

15.—Para el aislamiento de estreptococos de la faringe se recomienda el medio de Pike para concentrados, a la vez que es útil el

medio gelosa Mitis-Salivarius. Para el aislamiento de estafilococos patógenos de las heces se recomiendan los medios de cultivo llamados por la casa Difco "Estafilococcus Medium No. 110" y "Chapman Stone".

16.—Es indispensable que el laboratorio esté informado del origen del material que se examina y de la sospecha clínica de cual puede ser el agente causal de la enfermedad.

CONCLUSIONES

Se dan las técnicas que a nuestro juicio son mejores para el aislamiento de los cocos Gram Positivos:

- 1.—Estudiar la producción de coagulasa por los estafilococos.
- 2.—Estudiar la producción de catalasa.
- 3.—Estudiar la producción de pigmento por los estafilococos.
- 4.—Estudiar la lisis de los neumococos por las sales biliares.
- 5.—La fórmula de preparación del medio de Pike.
- 6.—La determinación del título de antiestreptolisinas en el suero sanguíneo.

BIBLIOGRAFIA

1. --Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Hitchens, A. P.: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", Ed. 6, Baltimore, Williams & Wilkins, 1948.
2. --Dubos, R. J.: Bacterial and Mycotic Infections of Man. Ed. 1, Philadelphia, J. B. Lippincott, Company, 1948.
3. --Auerback, H. and Felsenfeld O.: An Unusual Strain of Streptococcus Isolated from Subacute Bacterial Endocarditis, J. of Bact. 56: 587-588, Nov. 1948.
4. --B. B. L. Productos Manual, Ed. 2, Baltimore, 1950.
5. --White, J. C. and Niven, C. F.: Streptococcus S. B. E.: A Streptococcus Associated with Subacute Bacterial Endocarditis, J. of Bact. 51: 717-729, Jun. 1946.
6. --Lamna, C.: A non-Life Cycle Explanation of the Diptherioid Streptococcus from Endocarditis, J. of Bact., 47: 327-334, April 1944.
7. --Mellon, R. R. Haddley, P. B. and Haddley, F. P.: Possible Epidemiologic Bearing of Antigenic Reconstitutions Occurring in Rough and Diptherioid Cyclostages of hemolytic Streptococci. J. of Bact., 47: 437-474. May, 1944.
8. --Ostrolenk, M. and Hunter, A. C.: The Distribution of Enteric Streptococci. J. of Bact., 51: 735-741. Jun. 1946.
9. --Niven, C. F. and Sherman, J. M.: Nutrition of Enterococci. J. of Bact., 47: 335-341, April 1944.

- 10.—Cambell, J. J. R. and Gunsalus, I. C.: Citric Acid Fermentation by Streptococci and Lactobacilli. *J. of Bact.* 48: 71-76, July 1944.
- 11.—Gunsalus, I. C., Niven, C. F. and Sherman, J. M.: The Identification of "Streptococcus Lactis R". as a Strain of Streptococcus Faecalis. *J. of Bact.*, 48: 611, Nov. 1944.
- 12.—Winter, C. E. and Sandholzer, L. A.: Isolation of Enterococci from Natural Sources. *J. of Bact.*, 51: 588, May, 1946.
- 13.—Evans, A. C. and Chinn, A. L.: The Enterococci: With Special Reference to their Association with Human disease, *J. of Bact.*: 54, 495-512, Oct. 1947.
- 14.—Chapman, G. H. and Berens, C.: The Relative Incidence of Streptococcus Salivarius and Streptococcus mitis in man. *J. of Bact.*, 47: 473, May, 1944.
- 15.—Niven, C. F. Jr. and White, J. C.: A Study of Streptococci Associated with Subacute Bacterial Endocarditis. *J. of Bact.* 51: 790, June 1946.
- 16.—Mirick, G. S., Thomas, L., Curnen, E. C., and Horsfall, F. L. Jr., Studies on a non-hemolytic Streptococcus isolated from the Respiratory Tract of Human Beings. I. Biological Characteristics of Streptococcus M. G. II. Immunological Characteristics of Streptococcus M. G. III. Immunological relationship of Streptococcus M. G. to Streptococcus Salivarius type. *S. Exp Med.*, 80: 391-440, 1944.
- 17.—Evans, A. C.: Studies on Hemolytic Streptococci. VIII Streptococcus Equisimilis; *J. of Bact.*, 48: 267-284, Sept. 1944.
- 18.—Evans, A. C.: Studies on Hemolytic Streptococci. IX Differentiation of Species in Streptococci of Group. A. *J. of Bact.*, 53: 489-496, April 1947.
- 19.—Morton, H. E. and Sommer, H. E.: The variation of groups C Hemolytic Streptococci, *J. of Bact.*, 47: 123-128, Feb. 1944.
- 20.—Rammelkamp, C. H. and Dingle, JH.: Pathogenic Streptococci. *Annual Review of Microbiology.* II: 279-299, 1948.

21. --Christensen, L. R.: The Mechanism of Streptococcal Fibrinolysis. *J. of Bact.*, 47: 471-472, May, 1944.
22. --Foubert, E. L. Jr. and Douglas, H. C.: Studies on the Anaerobic Micrococci. I. Taxonomic Considerations. *J. of Bact.*, 56: 25-34, July 1948.
23. --Chapman, G. H.: The Significance of Sodium Chloride in Studies of Staphylococci. *J. of Bact.* 50: 201-204, Aug., 1945.
24. --Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures, Ed. 8, Detroit, 1948.
25. --Glenny, A. T. and Stevens, M. F.: Staphylococcus toxius and antitoxius. *J. Path. and Bact.*, 40: 201-210, 1935.
26. --Smith, M. L. and Price, S. A.: I. Staphylococcus betta haemolysin, II. Staphylococcus gamma haemolysin, *J. Path. and Bact.*, 47: 361-393, 1948.
27. --Evans, J. B., and Niven, C. F. Jr.: A Comparative Study of Known Food-Poisoning Staphylococci and Related Varieties. *J. of Bact.*, 59: 545-550, April, 1950.
28. --Chapman, G. H.: Difference in Susceptibility of Human Blood to coagulation by Staphylococci. *J. of Bact.*, 50: 119, July 1945.
29. --Chapman, G. H.: The Isolation of Pathogenic Staphylococci from feces, *J. of Bact.*, 47: 211-212, Feb. 1944.
30. --Evans, J. B., Buettner, L. G. and Niven, C. F.: Evaluation of Staphylococci Associated with Food Poisoning, *J. of Bact.*, 60: 481-484, Oct. 1950.
31. --Chapman, G. H.: The value of concentrated human whole blood and agar cultures for testing the coagulatin Power of Staphylococci. *J. of Bact.*, 50: 234, August, 1945.
32. --Chapman, G. H.: Advantage of incubation at 30°C for the Study of Staphylococci. *J. of Bact.*, 53: 367-368, March 1947.
33. --Yesair, J., Cameron, E. J. and Bohrer, C. W.: Comparative

- Resistance of Desiccated and Wet Micrococci Heated under Moist and Dry Conditions. *J. of Bact.*, 47: 437-438, May, 1944.
- 34.—Lyons, C.: Antibacterial Immunity to *Staphylococcus Pyogens*, *Brit. J. Exp. Path.*, 18: 411-422, 1937.
 - 35.—Roe, A. S. and Adams, M. H.: A Partially Defined Medium for the cultivation of the *Pneumococcus*. *J. of Bact.*, 47: 432, May, 1944.
 - 36.—Badger, E.: The Nutritional Requirements of a Strain of Type III *Pneumococcus*. *J. of Bact.*, 47: 509-518, May, 1944.
 - 37.—Foley, M. K. and Schaub, J. G.: Importance of the use of Thiologycollate Medium in Diagnostic Bacteriology. *J. of Bact.*, 47: 455, May, 1944.
 - 38.—Janeway, C. A.: Method for obtaining Rapid Bacterial Growth in Cultures from Patients under Treatment with Sulfonamides. *J. A. M. A.*, 116: 941-942, 1941.
 - 39.—Woodruff, H. B. and Foster, J. W.: Microbiological Aspects of Penicillin. VII Bacterial Penicilinase. *J. of Bact.*, 4: 7-17, 1945.
 - 40.—Schaub, J. G. and Foley, M. K.: Methods for Diagnostic Bacteriology. Ed. 2, St. Louis, The C. V. Mosby Company, 1943.
 - 41.—Mac Neal, W. J. and Blevius, A.: Bacterial Studies in Endocarditis. *J. of Bact.*, 49: 603-610, June, 1945.
 - 42.—Pile, R. M.: Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. An Enrichment Broth for Isolating Hemolytic Streptococci from Throat Swabs, 57: 186-187, 1944.
 - 43.—Chapman, G. H.: The Isolation of Streptococci from mixed Cultures. *J. of Bact.*, 48: 113-114, July, 1944.
 - 44.—Chapman, G. H.: The Reliability of Bromthymol-Blue Lactose Agar and Bacto Phenol-Red Mannitol Agar for the Isolation of Pathogenic Staphylococci. *J. of Bact.*, 48: 555-557, Nov. 1944.

- 45.—Charman, G. H.: Comparison of Lucllam's Medium with Staphylococcus Medium Number 110 for the Isolation of Staphylococci that Clot Blood. *J. of Bact.*, 58: 823, Dec. 1949.
- 46.—Simmons, J. S. and Gentsknow, C. J.: *Laboratory Methods of the United States Army*. Ed. 1, Philadelphia, 1944.
- 47.—Sevag, M. G., and Green, M. N.: The Role of Carbohydrates in the Development of Pigment by *Staphylococcus Aureus*. *J. of Bact.*, 48: 496, Sept, 1944.
- 48.—Cutler, R. P. and Winters, W. L.: A Modified Technique for the Differentiation of Pneumococci from Alpha Hemolytic Streptococci using Sodium Desoxycholate. *J. of Bact.*, 32: 572-575, May, 1947.
- 49.—Rantz, L. A. and Randall, E.: A modification of the Technic for Determination of the Anti-Streptolysin titer. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 59: 22-25, April, 1945.