VOLUMEN 18. 1965 ENERO - JUNIO. NUMEROS 1 - 2

Microbiología Española

publicada por
el Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 160 PTA; extranjero, 200 PTA

Número: España, 45 PTA; extranjero, 55 PTA

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA» DEL C. S. I. C.

ANALES DE EDAFOLOGIA Y AGROBIOLOGIA (publicada por el Instituto Nacional de Edafología y Agrobiología. Madrid). Mensual. Suscripción: España, 160 PTA; extranjero, 240 PTA. Número: España, 20 PTA; extranjero, 30 PTA.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE «AULA DEI» (Estación Experimental de «Aula Dei». Zaragoza). Irregular. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 190 PTA; extranjero, 220 PTA. Número: España, 200 PTA; extranjero, 230 PTA.

ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 175 PTA. Número: España, 160 PTA; extranjero, 185 PTA.

ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 80 PTA; extranjero, 100 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.

ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 165 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 60 PTA.

CEDRO (Instituto de Estudios de Jardinería y Arte Paisajista. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 160 PTA. Número: España, 30 PTA; extranjero, 45 PTA.

COLLECTANEA BOTANICA (Instituto Botánico Municipal. Barcelona). Anual. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 125 PTA. Número: España, 110 PTA; extranjero, 135 PTA.

CURSILLOS Y CONFERENCIAS DEL INSTITUTO «LUCAS MALLADA» (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Anual. Suscripción: España, 50 PTA; extranjero, 80 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 70 PTA.

ESTUDIOS GEOLOGICOS (Instituto «Lucas Mallada», de Investigaciones Geológicas. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

FARMACOGNOSIA (Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España, 120 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 35 PTA; extranjero, 45 PTA.

GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 80 PTA; países restantes, 120 PTA. Número: España y Portugal, 25 PTA; países restantes, 35 PTA.

PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 100 PTA; extranjero, 150 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 60 PTA.

MICROBIOLOGIA
ESPAÑOLA

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio Huertos, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

INDICE

Página

Estudio de secciones ultrafinas de *Clostridium tetani* y sus formas L fijas, por microscopía electrónica, por *M. Rubio-Huertos* y *Cándida González* 1

Estudio comparativo del componente graso del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas, por *M. Santaolalla* 13

Contribución al estudio epidemiológico del estafilococo, por *J. Repáraz* 23

Algunos factores que afectan a la multiplicación del virus de la encefalitis de San Luis cultivado en células HeLa y de amnios humano, por *M.ª del Pilar Vilas* 49

Algunos factores que afectan a la multiplicación del virus de la encefalitis Japonesa B cultivado en células HeLa y de amnios humano, por *M.ª del Pilar Vilas* 81

Estudio preliminar del fenómeno de infección persistente producido en células HeLa y de amnios humano por los virus de las encefalitis de San Luis y Japonesa B, por *M.ª del Pilar Vilas* 101

Estudio citológico, curva de crecimiento y consumo de glucosa del *Aerobacter aerogenes* irradiado, por *L. C. Verna, Teresa S. De Daurat* y *M.ª Eugenia Grela* 113

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

ESTUDIO DE SECCIONES ULTRAFINAS DE *CLOSTRIDIUM TETANI* Y SUS FORMAS L FIJAS, POR MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA

por

M. RUBIO-HUERTOS y CÁNDIDA GONZALEZ

INTRODUCCION

Las formas L de las bacterias, desde su descubrimiento por Klieneberger-Nobel en 1935 (3), han sido estudiadas extensamente por diferentes investigadores (1, 8 y 12), y sobre todo aquellas inducidas por adición de penicilina al medio de cultivo, método empleado corrientemente y cuyo mecanismo de inducción fue puesto de manifiesto por Park y Strominger (5). El efecto inductor de formas L, de la glicocola y otros aminoácidos es muy parecido al de la penicilina, pero su mecanismo de acción no es conocido y solamente se han podido obtener formas L fijas o estables por este procedimiento en muy pocos casos, siendo uno de éstos el conseguido por nosotros con el *Clostridium tetani* (7), en el que también se ha podido comprobar que las formas L fijas obtenidas con glicocola conservaban el poder patógeno e incluso producían más toxina que la estirpe normal (2).

En los trabajos que hemos realizado anteriormente con diversas bacterias gram-negativas, empleando glicocola y penicilina (6 y 8) pudimos ver que aunque la acción es parecida, las formas L obtenidas con glicocola son resistentes al choque osmótico, y en el caso de las for-

mas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens,* conservan una envoltura celular o pared bien definida (aunque su composición química varíe respecto a la normal (11) membrana citoplásmica y una organización celular similar a la de la forma normal. Las formas L del *Clostridium tetani* no tienen esporas.

En el presente trabajo estudiamos la citología en el microscopio electrónico por medio de secciones ultrafinas de las formas L fijas de *Clostridium tetani* y de su forma bacilar normal.

MATERIALES Y METODOS

Hemos empleado una estirpe de *Clostridium tetani* del Instituto Ibys, cultivándola en medio VF, preparado de la siguiente forma:
Se digieren a 48 °C durante veinte horas, 3.600 kg de carne de buey desgrasada y 1 kg de hígado de buey, en 150 cm^3 de ácido clorhídrico puro y 10 g de pepsina (título, 500); a 1.000 cm^3 de este medio base se le añaden 9 cm^3 de lejía de sosa pura (36° Baumé), se calientan a 120 °C y se filtran sobre papel laurent. Se reparten en tubos y esterilizan a 110 °C, durante treinta minutos (*).

La forma L fue la obtenida por medio de glicocola por Rubio y González (7), que se conserva en la colección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, y se cultivó asimismo en el medio VF.

La fijación y proceso de inclusión fue hecha para la forma L y normal de la manera siguiente:

Separamos las células del medio líquido de cultivo por centrifugación a 3.000 r/m durante treinta minutos; lavamos con agua destilada y centrifugamos de nuevo para eliminar el agua de lavado y se fija en tetraóxido de osmio al 2 por ciento en tampón de acetato de veronal, de pH 7,2, durante dos horas, en frío (4 °C). Se centrifuga otra vez hasta conseguir un sedimento compacto; se elimina el líquido de la fijación y se añade a dicho sedimento unas gotas de agar fundido para formar un bloque con las células, al enfriarse. Este bloque se corta en trozos de 1 mm^3 y se deshidratan los trozos en pases sucesivos de acetona, a concentraciones crecientes, incluyéndose por fin en durcupan, que se endurece durante veinticuatro horas en estufa a 55 °C.

(*) Prevot y Boorsma. 1939. Ann. Inst. Pasteur, 63, 300.

Las secciones fueron cortadas en un ultramicrotomo LKB ultratome, con cuchilla de vidrio y se examinaron en el microscopio electrónico Siemens Elmiskop I, del Servicio de Microscopía Electrónica de la División de Ciencias del C. S. I. C., con una aceleración de 80 *kW* y 20.000 aumentos directos.

Algunos de los cortes fueron teñidos con citrato de plomo antes de ser observados.

RESULTADOS

Formas bacilares normales

Las formas bacilares normales tienen la morfología típica del *Clostridium tetani* observado con microscopio normal, es decir, son células alargadas, con los bordes achatados. La pared celular está constituida por una doble membrana perfectamente definida, con un espacio claro entre ambas *(figura 1 b);* un poco separada de esta pared se encuentra la membrana citoplásmica, íntimamente unida en su mayor parte al citoplasma *(figura 1 c)*. Se han observado mesosomas.

El citoplasma es denso y granular, muy homogéneo, con zonas irregulares transparentes a los electrones, que constituyen el nucleoplasma y en cuyo interior se pueden observar finas fibrillas de los núcleos bacterianos *(figura 1 N)*.

Formas L

Las formas L del *Clostridium tetani* observadas en el microscopio normal, son compactas, esféricas o de forma irregular y siempre formando paquetes de células, muy difíciles de disgregar. En el microscopio electrónico aparecen también irregulares, a veces esféricas y con caracteres citológicos que difieren en su mayor parte de los observados en las formas bacilares.

La envoltura celular está formada por una doble membrana, pero carece de la tercera, más externa, observada en las formas bacilares; también se observa que, de las dos membranas, la más externa aparece más fina que la interna, bien que en algunas formas sólo hemos observado una membrana única *(figura 2 M)*.

Un hecho de gran interés, que más adelante discutiremos, es la pre-

sencia de mesosomas en un 30 por ciento de las formas L *(figura 2 ms);* esto posiblemente esté relacionado con la presencia de numerosos tabiques distribuidos de manera anárquica en el interior de estas formas, los que se ponen aún mejor de manifiesto en las formas que han perdido su contenido protoplásmico *(figuras 2, 3 T y 4).*

El citoplasma es similar al de las formas bacilares, granuloso y muy denso en la mayoría de las células.

En algunas células, el citoplasma es irregular, es decir, se agrupa en pequeñas manchas más o menos esféricas, dejando vacío el resto de la célula *(figura 4).*

Los núcleos están formados por la típica vacuola, con filamentos o grumos muy opacos a los electrones, en su interior. Su distribución a veces es bastante irregular *(figuras 3 y 4 N),* de forma que algunas veces entran en contacto con la membrana citoplásmica o con los septos o tabiques, que como hemos dicho antes son también muy irregulares.

A veces se encuentran tres o cuatro células unidas por una fina membrana común, lo que puede explicar la dificultad de disgregar los grumos de células que se observan en el microscopio normal *(figura 4 M).*

Como ya se había observado en microscopía normal, las formas L no forman esporas ni hemos encontrado por microscopía electrónica siquiera un rudimento de su formación.

DISCUSION

Está generalmente admitido que las bacterias en su forma L estable han perdido su capacidad de formar la pared celular normal, y esto parece también que interfiere con su mecanismo de división, ya que la multiplicación de las formas L es en general difícil. Algunas necesitan medios especiales con suero, sulfato magnésico, agar blando, etc.; otras son incapaces de multiplicación o lo hacen muy lentamente en medio líquido. Sin embargo, en el caso de las formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens,* éstas crecen en medios corrientes para las bacterias en general, tal como el caldo común, y su curva de crecimiento es similar a la de la forma normal. Las formas L fijas del *Clostridium tetani* crecen con mayor lentitud que las normales en medio idéntico, VF, pero, en general, crecen bien.

Observadas en el microscopio electrónico, las formas L del *Clostri-*

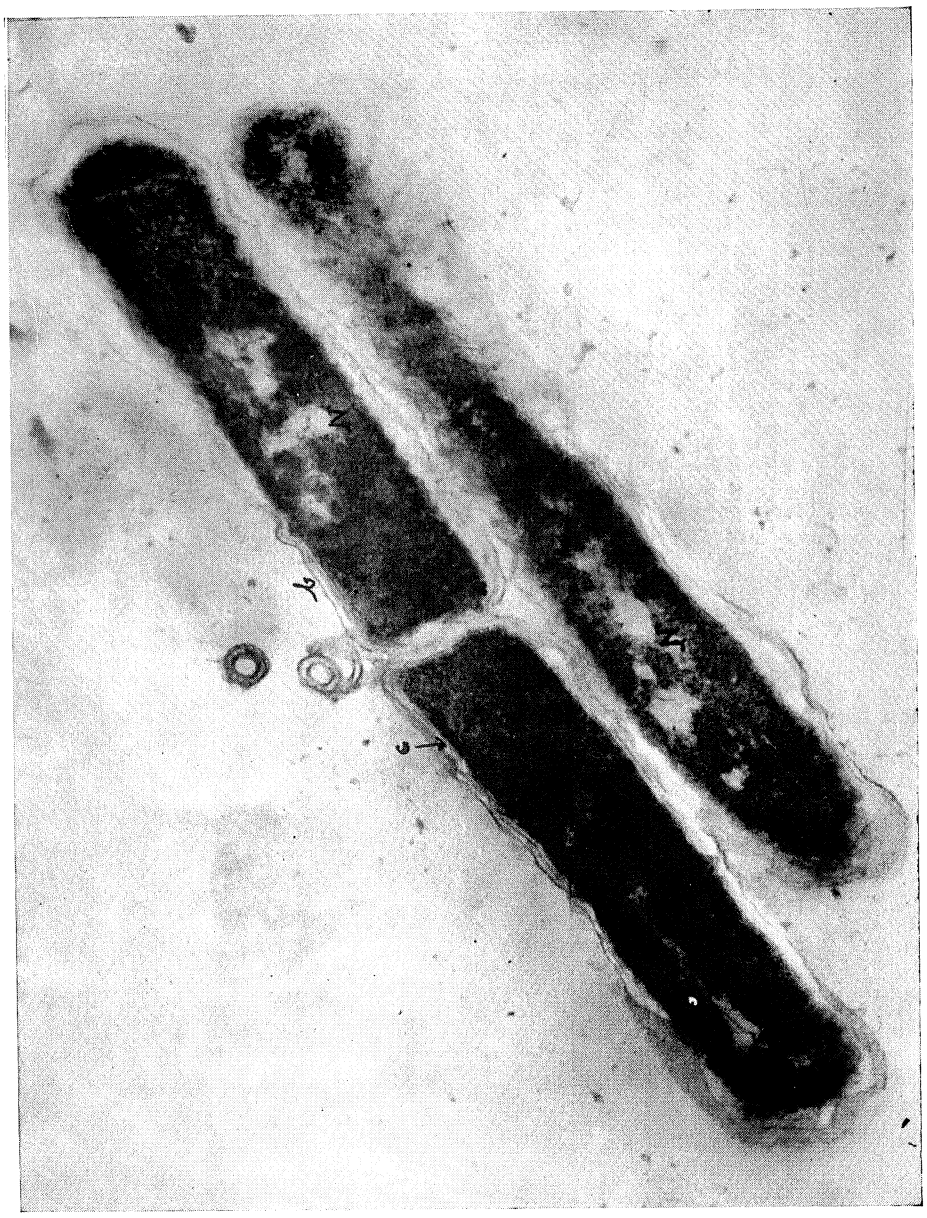


Figura 1. Clostridium tetani. *Forma normal. Original* × 20.000

Figura 2. Cl. tetani. *Formas L fijas mostrando doble membrana, mesosomas y tabiques. Original* × 20.000

Figura 3. Cl. tetani. *Formas L. Tabicación y zonas nucleares desordenadas. Original* × 20.000

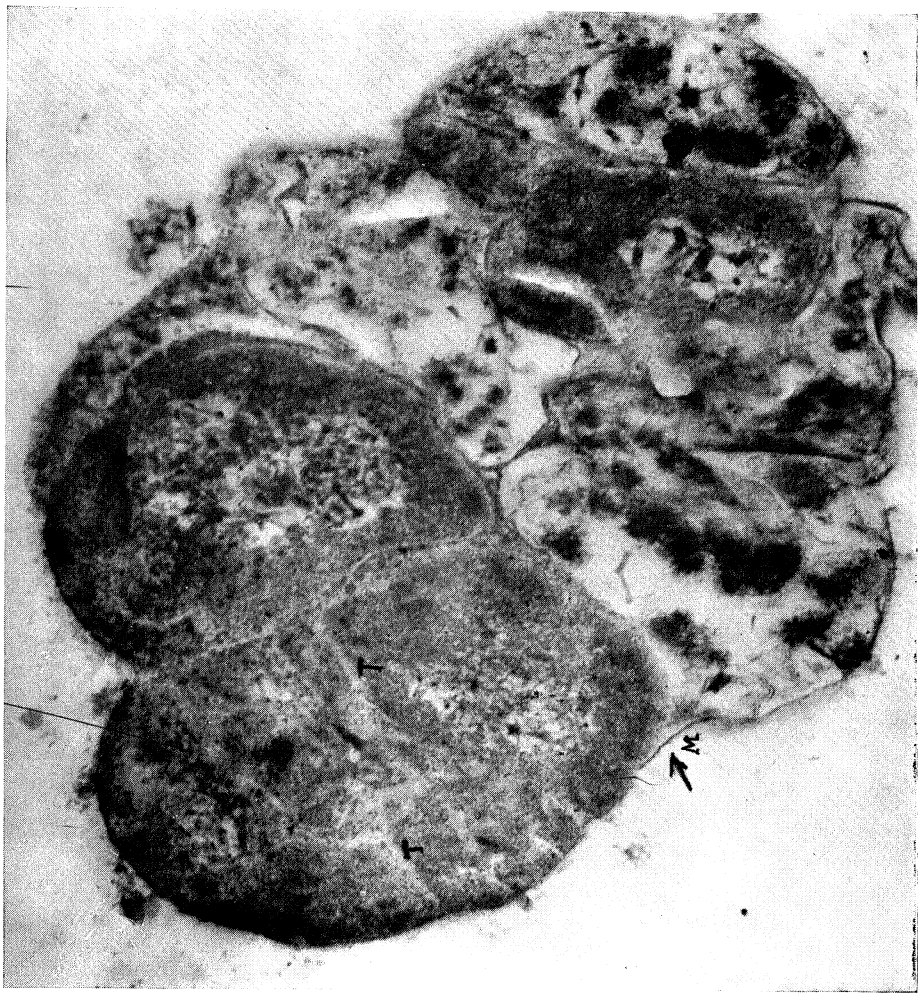


Figura 4. Cl. tetani. *Como la anterior. Se advierte una membrana rodeando a varias células. Original* × 20.000

dium tetani poseen una membrana (*) externa menos, y a veces dos, que la forma normal, formando una envoltura más definida que la observada por Ryter y Landman (10), en secciones ultrafinas de formas L obtenidas por medio de penicilina y las inducidas por lisozima; esta envoltura resiste además el choque osmótico, en lo que se diferencia también de las citadas anteriormente.

Según los mismos autores (10), la carencia de mesosomas en las formas L del *Bacillus subtilis* y *B. licheniformis* obtenidas por lisozima, sería la razón fundamental para las irregularidades de la división de dichas formas L, puesto que ellos creen necesaria la presencia de mesosomas para la formación de septos e incluso para la formación de la pared celular. Sin embargo, en las formas L del *Clostridium tetani* observamos la presencia de numerosos mesosomas *(figuras 2 ms)* y además la formación de septos; pero precisamente donde creemos nosotros que residen las anomalías en la división celular es en la formación desordenada de septos, en donde no se dividen las células proporcionalmente, pues los tabiques a veces comprenden partes del citoplasma sin núcleo y además, en una célula se pueden formar simultáneamente varios septos, dividiendo dicha célula en porciones de tamaño irregular, por lo que se pueden observar células de tamaño muy variable. Este desorden en la formación de septos parece más bien un desorden de tipo genético, así como el hecho de que estas formas L sean incapaces de formar esporas, pues, citológicamente, no se advierte ninguna razón por la que no puedan formarse. Según McQuillen (4), las células que normalmente forman esporas, si cuando están en condiciones de hacerlo son tratadas con lisozima, los protoplastos resultantes continúan el proceso y también forman esporas, aunque en número algo menor que la bacteria normal.

La irregularidad de distribución del nucleoplasma en algunos casos, es posible que esté producida por el desorden en la formación de septos, pero también pudiera ser lo contrario, es decir, si la relación núcleo/membrana citoplásmica o mesosomas es necesaria para iniciar la for-

(*) Cuando decimos membrana nos referimos a cada «capa» de la pared celular y a la propia membrana citoplásmica en último lugar, como membrana más interna, ya que en el microscopio electrónico, tanto las capas que constituyen la pared celular como la membrana citoplásmica vienen representadas por una línea continua oscura, separada de la siguiente línea oscura por un espacio claro más o menos grande.

mación de los tabiques, según Ryter y Jacob (9) y Ryter y Landman (10), el origen de ambas irregularidades estaría en la orientación o atracción núcleo-mesosoma, que debe realizarse ordenadamente en las células normales, es decir, con un ritmo en el tiempo y en la zona de contacto, y, por el contrario, desordenadamente en las formas L, mecanismo probablemente inducido por alguna sustancia química y controlada por algún gen.

La presencia de mesosomas en las formas L estables de *Clostridium tetani* hace que no podamos aceptar la idea postulada por Ryter de que la incapacidad de formar pared celular en las formas L fijas está directamente relacionada con la falta de mesosomas.

RESUMEN

Las formas bacilares normales de *Clostridium tetani* observadas al microscopio electrónico, son alargadas, con las puntas casi cuadradas, están envueltas por una pared celular formada por tres capas y una membrana citoplásmica. El citoplasma es granular y bastante denso. El nucleoplasma es una zona más transparente a los electrones en el centro de la célula y en ella se encuentran las fibrillas típicas de los núcleos bacterianos.

Las formas L cultivadas y observadas de la misma manera, carecen de una de las membranas exteriores y a veces de dos de ellas, su citoplasma es granuloso y compacto y en él se pueden observar numerosos mesosomas, tabiques intracelulares o septos dispuestos irregularmente y los elementos nucleares también distribuidos desordenadamente en algunas células. Las formas L carecen de esporas.

Se discuten las diferencias encontradas con respecto a la multiplicación de ambas formas, sobre todo en su relación con la presencia de mesosomas en las formas L.

SUMMARY

Normal bacillary forms of *Clostridium tetani* observed at the electron microscope in ultrathin sections showed a definite cell wall and cytoplasmic membrane, a granular cytoplasm rather dense and the nucleoplasm as a light electron area with dense fibrills within.

Glycine induced stable pathogenic forms of *Clostridium tetani* grown

in the same medium as the normal ones showed lack of one or two of the external membranes; a granular cytoplasm and mesosomes in most of the cells. Septa, irregularly distributed in the cytoplasm were observed in several cells. The nuclear material was also in some cases irregularly placed. The L forms do not form spores. The postulate that the loss of mesosomes in the L forms is the cause of inhability to form new cell wall do not seems to be correct, after our finding of stable L forms with mesosomes.

BIBLIOGRAFIA

1. DIENES, L. 1948. The insolation of type L cultures from bacteroides with the aid of penicillin and their reversion into the usual bacilli. J. Bacteriol., 56 445-56.
2. GONZÁLEZ, C. 1961. Etude comparée de deux souches de *Cl. tetani* et de leurs formes L (colonie B), obtenues par l'action de la glycine. Antoine van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol., 27, 19-26.
3. KLIENEBERGER-NOBEL, E. 1935. The natural occurrence of pleuropneumonialike organisms in apparent symbiosis with *Streptobacillus moniliformis* and other bacteria. J. Pathol. Bacteriol., 40, 93-105.
4. MCQUILLEN, K. 1960. Bacterial protoplasts. *En* The Bacteria, I. Academic Press, Nueva York.
5. PARK, J. T., y STROMINGER, J. L. 1957. Biochemical basis for the mechanism of action of penicillin and for its selective toxicity. Science, 125, 99-101.
6. RUBIO-HUERTOS, M., y BELTRÁ, R. 1962. Formas L fijas del *Agrobacterium tumefaciens* obtenidas por medio de glicocola. Microbiol. Españ., 15, 219-30.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y GONZÁLEZ, C. 1960. Morphology and pathogenicity of L forms of *Clostridium tetani* induced by glycine. Ann. N. Y. Acad. Sci., 79, 626-31.
8. RUBIO-HUERTOS, M.; KUSTER, E., y FLAIG, W. 1954. Licht und elektronenmikroskopische untersuchungen an L-formen bei *Pseudomonas fluorescens*, *B. Proteus* und *Rhizobium*. Zentr. Bakteriol. Parasitenk. Abt. I. Orig., 162, 24-31.
9. RYTER, A., y JACOB, F. 1963. Etude au microscope électronique des relations entre mésosomes et noyaus chez *Bacillus subtilis*. Compt. Rend., 257, 3.060-63.
10. RYTER, A., y LANDMAN, O. E. 1964. Electron microscope study of the relationship between mesosomes loss and the stable L state (or protoplast state) in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol., 88, 457-67.
11. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. Microbiol. Españ., 16, 25-39.
12. TULASNE, R. 1953. Le cycle L et les formes naines des bacteries. *En* Symposium Citologia batterica, 144-81. Suplemento de Rend. Ist. Super. Sanitá.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
E INSTITUTO DE EDAFOLOGIA Y BIOLOGIA VEGETAL
SECCION DE MICROORGANISMOS PARASITOS DE LAS PLANTAS

ESTUDIO COMPARATIVO DEL COMPONENTE GRASO DEL *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* Y DE SUS FORMAS L FIJAS

I. Aislamiento de las distintas fracciones lipídicas

por

M. SANTAOLALLA

INTRODUCCION

En un trabajo anterior (8) estudiamos las diferencias en la composición química del componente glucoproteico de las paredes celulares del *Agrobacterium tumefaciens* y sus formas L fijas. En el presente, hacemos un estudio de los lípidos extraídos de estos microorganismos, intentando establecer las diferencias fundamentales de sus componentes grasos. Las bacterias fueron cultivadas en medios y condiciones idénticas.

MATERIALES Y METODOS

Empleamos el *Agrobacterium tumefaciens* estirpe AT de la vid, que cultivamos en matraces de Erlenmeyer de 6 l, en caldo común, con agitación a 25 °C. A las cuarenta y ocho horas, aproximadamente, centrifugamos para separar los microorganismos y lavamos éstos con agua estéril, secándolos a continuación a 50 °C hasta peso constante.

En un medio idéntico y condiciones análogas, cultivamos las formas L

fijas del *Agrobacterium tumefaciens* conseguidas y suministradas por los doctores Rubio y Beltrá (7).

Extracción y purificación de la grasa

La sustancia seca la tratamos, primero, con una mezcla de alcohol absoluto y éter sulfúrico (3 : 1, v/v) durante veinticuatro horas, a temperatura ambiente; separamos el disolvente y tratamos el residuo con la mezcla cloroformo-metanol (2 : 1, v/v), también a temperatura ambiente durante veinticuatro horas. Estos residuos grasos los purificamos por tratamiento con tres pequeñas porciones sucesivas de éter de petróleo. Sobre esta grasa purificada hacemos las determinaciones que se citan seguidamente.

Indice de yodo

Determinación de nitrógeno

Empleamos el método corriente de micro-Kjeldahl.

Determinación de fósforo

Se determinó por el método colorimétrico de Fiske y Subarow, utilizando para la lectura el fotocolorímetro de Klet con el filtro de 630 mμ.

Determinación de los aminoácidos de la lipoproteina

El residuo proteico, separado de la grasa en la purificación, fue hidrolizado en tubo cerrado con ClH 6 N, calentando en estufa a 115 °C durante dieciséis horas; evaporado el líquido a sequedad en estufa, a 55 °C, se disuelve el residuo en agua destilada, haciendo dos evaporaciones consecutivas para eliminar las trazas de ácido clorhídrico; se disuelve este residuo en agua destilada y con él hacemos la cromatografía.

Cromatografía de desarrollo descendente

Monodimensional. Disolvente: butanol-n, 40; etanol, 10; ácido acético, 10; agua, 20.

Bidimensional. Disolventes: 1) fenol al 80 por ciento, en agua; 2) butanol-n, 80; ácido acético, 20; agua, 20.

Revelador: solución de ninhidrina al 1 por mil, en alcohol isobutílico al 90 por ciento.

Fraccionamiento de los lípidos

Empleamos el método de Hirsch y Ahrens (2), basado en la cromatografía en columnas con ácido salícico (Mallinkrodt), previamente lavado con acetona y éter sulfúrico, secándolo después a baja temperatura; los disolventes, volúmenes y distintas fracciones eluidas se indican en el *cuadro 1.*

Cuadro 1

Eter en hexano Porcentaje	Metanol en cloroformo Porcentaje	Centímetros cúbicos	Fracción eluida
1,5		50	Colesterol esterificado
4,0		50	Triglicéridos
8,0		50	Acidos grasos libres
15,0		50	Colesterol libre
30,0		50	Diglicéridos
80,0		50	Monoglicéridos
	15	100	Cefalinas
	25	200	Lecitinas
	70	100	Esfingomielinas
	100	200	Isolecitinas

De las distintas fracciones, fue eliminado el disolvente a baja temperatura y fueron pesadas.

Investigación de colesterol

Empleamos la reacción de Liebermann, que consiste en añadir anhídrido acético y unas gotas de ácido sulfúrico a la disolución clorofórmica del problema; la reacción positiva origina un color azul, que pasa al rosa y después verde. Comprobamos precipitando el digitónido de color blanco sedoso, formado al añadir a la solución alcohólica caliente digitonina disuelta en alcohol.

RESULTADOS

Forma normal del Agrobacterium tumefaciens

6,4273 g de sustancia seca los tratamos con 180 ml de la mezcla alcohol + éter; la grasa obtenida mediante este tratamiento fue 0,1669 g, que equivalen al 2,59 por ciento. El residuo se trató con la mezcla cloroformo + metanol, obteniéndose 0,3962 g, equivalentes al 6,16 por ciento. El total de grasa impura obtenida mediante estos dos tratamientos fue 0,5631 g, que equivalen al 8,75 por ciento del peso seco de que partimos *(cuadro 2)*.

Purificamos estas dos fracciones de grasa por separado, mediante el tratamiento indicado con éter de petróleo, obteniendo las siguientes cantidades de lo que denominamos grasa pura:

De los 0,1669 g	obtenemos	0,1500 g
0,3962	... ...	0,3762
	Total	0,5262 g

que corresponden al 8,18 por ciento.

Con esta grasa pura realizamos los siguientes ensayos *(cuadro 3)*:

Indice de yodo	72
Nitrógeno (media)	1,88 %
Fósforo (media)	1,91 %
Relación P/N (media)	1,01

No hicimos análisis cromatográfico de la parte proteica separada al purificar la grasa, por considerarla en este caso ínfima, como corresponde a la diferencia entre 8,75 y 8,18 por ciento.

Los resultados obtenidos correspondientes a los distintos componentes de la grasa, separados por cromatografía en columna, se mencionan en el *cuadro 4*.

Cuadro 2

Sustancia seca de partida	Grasa extraída		*A. tumefaciens*			
			Forma normal		Forma L	
	Impura	Pura	Gramos	Porcentaje	Gramos	Porcentaje
→			6,4273		4,8344	
	Con alcohol + éter		0,1669	2,59	0,2834	5,89
	Con cloroformo + metanol		0,3962	6,16	0,2020	4,34
			0,5631	8,75	0,4854	10,23
		Con alcohol + éter	0,1500	2,33	0,2037	4,21
		Con cloroformo + metanol	0,3762	5,85	0,0957	1,98
			0,5262	8,18	0,2994	6,19

Cuadro 3

Indice de yodo	Nitrógeno	Fósforo	*A. tumefaciens*			
			Forma normal		Forma L	
	Grasa extraída con			Porcentaje		Porcentaje
→			72		66-67	
	Alcohol + éter			1,20		1,61
	Cloroformo + metanol			2,57		4,19
		Alcohol + éter		1,43		0,29
		Cloroformo + metanol		2,40		0,67
	Relación P/N (media)		1,01		0,16	

Cuadro 4

Fracciones separadas	*A. tumefaciens*	
	Forma normal	Forma L
	Miligramos	
Colesterol esterificado	3,8	4,8
Triglicéridos	3,0	2,3
Acidos grasos libres	4,5	10,4
Colesterol libre	17,0	60,7
Diglicéridos	22,7	16,9
Monoglicéridos	1,0	25,2
Cefalinas	59,0	34,7
Lecitinas	200,0	25,0
Esfingomielinas	98,4	15,1
Isolecitinas	11,6	3,1

Forma L del Agrobacterium tumefaciens

4,8344 g de sustancia seca se trataron con 140 ml de la mezcla alcohol + éter, obteniéndose 2,2834 g, que representan el 5,89 por ciento del residuo; por el tratamiento con la mezcla cloroformo + metanol separamos 0,2020 g de grasa, que equivalen al 4,34 por ciento. El total de grasa impura obtenida mediante las dos extracciones fueron 0,4854 g, que significan el 10,23 por ciento referido a peso seco.

Al purificar estos 0,4854 g de grasa por tratamiento con éter de petróleo, obtuvimos 0,2994 g de la grasa, que denominamos pura, que equivalen al 6,19 por ciento. La substancia separada de la grasa, una vez seca, es un sólido pulverulento de color blanco amarillento, con un contenido en nitrógeno entre el 12,6 y el 12,8 por ciento. El análisis cromatográfico de ella demostró que estaba compuesta de los siguientes aminoácidos: glicina, ácido glutámico, alanina, treonina, tirosina, valina, leucina, isoleucina y fenilalanina. No se encontró en esta sustancia ningún glúcido.

Con esta grasa pura realizamos los siguientes ensayos *(cuadro 3)*:

Indice de yodo	66-67
Nitrógeno (media)	2,90 %
Fósforo (media)	0,48 %
Relación P/N (media)	0,16 %

Las fracciones separadas cromatográficamente se mencionan en el *cuadro 4*.

DISCUSION

Del examen de los resultados obtenidos en el presente trabajo, resumidos en los cuadros anteriores, y sin intentar que las cifras correspondientes a las distintas fracciones obtenidas cromatográficamente correspondan a valores absolutos (en la actualidad estamos estudiando cada una de ellas), podemos exponer las diferencias más notables.

Mientras que de la forma normal del *Agrobacterium tumefaciens* extraemos inicialmente una grasa casi pura, a partir de la forma L obte-

nemos una lipoproteína que contiene alrededor del 40 por ciento de substancia proteica.

Los índices de yodo de ambas grasas son diferentes; lo mismo sucede con su contenido en nitrógeno. Las diferencias en fósforo y la relación fósforo : nitrógeno son muy significativas y concuerdan con el contenido en fosfolípidos de ambas grasas.

El colesterol se ha podido poner de manifiesto en la fracción correspondiente a la forma L, mediante la reacción de Liebermann, y también precipitándolo como digitónido; pero no en la forma normal.

Asselinean (1) señala que la única propiedad que distingue netamente los lípidos de origen bacteriano de los correspondientes a otras especies vivas, es la ausencia total o casi total en aquéllos de esteroides. Rebel y colaboradores (4), estudiando comparativamente los lípidos del bacilo *Proteus* y los de una forma L estable de él derivada, encuentran una proporción muy superior de colesterol en la forma L fija. Posteriormente, Krembel y colaboradores (3), estudiando también los lípidos de las formas L fijas del *Proteus,* obtienen una fracción que da débilmente positiva la reacción de Liebermann, pero este colesterol no lo pueden comprobar por cromatoplaca ni por espectroscopía infrarroja. Trabajos de Rebel y colaboradores (5) y Rebel y Mandel (6) indican que las formas L son incapaces de sintetizar el colesterol, pero si el medio lo contiene, éstas lo absorben y entonces ellos lo evidencian en la correspondiente fracción lipídica por la reacción de Liebermann positiva, por cromatografía sobre papel, sobre gel de sílice en capa fina, en columna de sílice, y por el estudio espectrofotométrico de sus derivados bromados y acetilados.

Smith y Rothblat (9) también demuestran mediante el empleo de sustancias marcadas con ^{14}C la incorporación de distintos esteroides en los organismos PPLO de origen humano cultivados en medio adecuado.

RESUMEN

Se ha realizado la extracción, purificación y fraccionamiento de la grasa del *Agrobacterium tumefaciens* y de su forma L fija, operando en condiciones análogas. La grasa correspondiente a la forma L resulta ser una lipoproteína con un contenido proteico equivalente al 40 por ciento. En la grasa de la forma normal, el contenido en fosfátidos, alrededor

del 70 por ciento, es mucho mayor que el correspondiente a la grasa de la forma L, 26 por ciento aproximadamente.

Es interesante señalar la presencia de colesterol en la grasa de la forma L, evidenciada mediante la reacción de Liebermann y la formación del digitónido por precipitación con digitonina.

SUMMARY

Purification and fractionation of fat from normal *Agrobacterium tumefaciens* and its fixed L form has been made in analogous conditions. The fat of the L form was a lipoprotein with a 40 per cent protein. The fat from the normal form had no protein and its content of phosphatids was about 70 per cent whereas the phosphatids from the L form amounted to 26 per cent approximately.

Cholesterol was found as a component of the fat from the L form. No cholesterol was found in the normal form.

BIBLIOGRAFIA

1. Asselinean, J. 1962. Les lipides bactériens. Hermann, Paris.
2. Hirsch, J., y Ahrens, E. H. 1958. J. Biol. Chem., 233, 211.
3. Krembel, J.; Deluzarche, A., y Minck, R. 1961. Compt. Rend., 253, 2.005.
4. Rebel, G.; Bader, A. M.; Sensenbrener, M., y Mandel, P. 1960. Compt. Rend., 250, 3.516.
5. Rebel, G.; Bader-Hirch, A. M., y Mandel, P. 1963. Bull. Soc. Chim. Biol., 45, 1.327.
6. Rebel, G., y Mandel, P. 1962. Compt. Rend., 255, 2.686.
7. Rubio-Huertos, M., y Beltrá, R. 1962. Nature, 195, 4.836.
8. Santaolalla, M. 1963. Microbiol. Españ., 16, 25.
9. Smith, P. F., y Rothblat, G. H. 1960. J. Bacteriol., 80, 842.

PENIBERICA, S. A.
LABORATORIO DE BACTERIOLOGIA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO DEL ESTAFILOCOCO (*)

por

J. REPÁRAZ

INTRODUCCION

Teniendo en cuenta que, entre otras muchas facetas suyas, el estafilococo puede ser considerado como el representante genuino de la resistencia a los antibióticos, no es extraño que su estudio haya despertado, y siga haciéndolo actualmente, un gran interés dentro del campo de la Bacteriología.

Precisamente por la importancia de estas cepas resistentes, algunas de ellas causantes de graves e incluso mortales septicemias; por el gran aumento en el número de infecciones hospitalarias; por su repercusión en la revisión de las normas higiénicas y procedimientos de esterilización en los centros sanitarios; por la utilidad de técnicas, tales como la de la tipificación por bacteriófagos, serología o antibiograma de una raza estafilocócica, etc., fue por lo que nos decidimos a llevar a cabo un estudio epidemiológico de este germen en Navarra, habida cuenta además de la escasez con que en nuestro país se realizan trabajos de esta especie.

Por otra parte, la especial circunstancia de poder estudiar las cepas del personal de una fábrica de antibióticos—la mayoría, jóvenes de los

(*) Este trabajo *in extenso*, fue presentado como tesis doctoral en la Facultad de Medicina de la Universidad de Navarra, obteniendo la calificación de sobresaliente.

pueblos con escasísimo contacto previo con tales productos—y compararlas con las de la población general y hospitalaria, viendo las posibles modificaciones biológicas en relación con la puesta en marcha de la fabricación de penicilina, primero, y más tarde, de estreptomicina y tetraciclina, hizo que durante un período de seis años nos dedicáramos con afán a la consideración de estos problemas.

MATERIAL Y TECNICAS

Se estudian comparativamente algunas características bioquímicas, patógenas y de resistencia a los antibióticos (coagulasa, fermentación del manitol, pigmento, fosfatasa, gelatinasa, hemolisina, penicilinasa, patrón de bacteriófagos y antibiograma) de 275 cepas estafilocócicas: 100 de empleados de una fábrica de antibióticos; 100 de niños de diferentes colegios de Pamplona y 75 del Hospital Provincial de Navarra (30 de personal sanitario; 30 de enfermos de distintas salas y 15 de lesiones estafilocócicas activas).

Obtención de cultivos

Salvo en estos últimos 15 casos, en los que la muestra se obtuvo directamente del foco infeccioso, en los 260 restantes fue tomada del interior de la nariz, a una profundidad de unos 2 cm. El método para su siembra, incubación y separación de colonias es de sobra conocido, por lo que citaremos solamente que se utilizaron placas de agar + sangre y medio de *Staphylococcus* 110 (DIFCO), siguiendo para su identificación la clave del manual de Bergey (6).

Pruebas biológicas

1) Coagulasa

Se realizó siempre con plasma de conejo diluido al 1/10 en solución salina estéril y cultivos de dieciocho horas en infusión de cerebro + corazón (DIFCO). La aparición de cualquier indicio de coágulo al cabo de tres horas, a 37 °C, fue considerado como prueba positiva. La calidad de los resultados fue comprobada en 20 casos (10 de ellos positivos) mediante plasma liofilizado de conejo (DIFCO).

2) Fermentación del manitol

Se empleó la técnica de Hugh y Leifeson (31).

3) Pigmento

Para su estudio seguimos la técnica de Christie y Keogh (14), empleando leche descremada en polvo (SAM) en lugar de leche fresca.

4) Fosfatasa

Interesados solamente en su respuesta cualitativa, adoptamos la técnica citada por Barber y Kuper (5).

5) Hemolisina

Se sembraron las cepas en placas de agar nutritivo con 3 por ciento de sangre de conejo desfibrinada, incubándolas durante toda la noche a 37 °C. Una vez examinadas, las placas negativas se mantuvieron otras veinticuatro horas a 4 °C, siendo nuevamente revisadas.

6) Gelatinasa

Con cada uno de los gérmenes se inocularon caldos con 12 por ciento de gelatina, incubándolos posteriormente a 37 °C durante veinticuatro horas. Cuando transcurrido este plazo no se observó licuación, se continuó esta incubación hasta un máximo de catorce días.

7) Penicilinasa

Hemos controlado la producción de penicilinasa exocelular en las 275 cepas, haciendo reaccionar a 37 °C la enzima contenida en 1 cm^3 de un cultivo de gérmenes de dieciocho horas con diferentes diluciones en tampón de una penicilina G patrón, valorando a continuación el remanente de antibiótico por el procedimiento habitual de difusión en agar (28).

8) Tipificación por bacteriófagos

En las cepas coagulasopositivas, esta técnica fue amablemente llevada a cabo por el «Public Health Laboratory Service», de Londres.

9) Sensibilidad a los antibióticos

Se utilizaron dos tipos de antibiograma:

a) Procedimiento de diluciones seriadas. Con él se determinó la sensibilidad de las 275 cepas a penicilina, 0,25, 0,50, 1 y 2 U.I./cm^3; estreptomicina, 5 y 10 γ/cm^3; tetraciclina, 5 y 10 γ/cm^3; y neomicina, 0,50 y 1 U.I./cm^3, en tubos con infusión de cerebro + corazón (DIFCO), inoculados con una cantidad de gérmenes aproximada de 1.000.000 de células/tubo (27).

b) Procedimiento de los discos. Se reservó para las coagulasopositivas, utilizando multidiscos (OXO). Los antibióticos controlados fueron: bacitracina, 5 U.I; cloranfenicol, 10 γ; eritromicina, 10 γ; estreptomicina, 10 γ; neomicina, 10 γ; novobiocina, 5 γ; oleandomina, 5 γ; penicilina, 1,5 U.I.; polimixina B, 10 γ y tetraciclina, 10 γ, siguiendo para su realización la técnica propuesta por la propia casa OXO (54).

En el primer procedimiento se consideró resistente a la penicilina a todo germen que mostrara crecimiento en las concentraciones de 1 ó más U.I./cm^3; a la estreptomicina, tetraciclina y neomicina, si el crecimiento era patente en 10 γ, 10 γ y 1 U.I./cm^3, respectivamente. Con la técnica de los discos solamente especificamos en los resultados si fue o no sensible a la concentración empleada, por la presencia o ausencia de halos de inhibición, pero sin tener en cuenta el tamaño de los mismos.

RESULTADOS Y DISCUSION

Dado el elevado número de resultados obtenidos (más de 6.000 datos) es forzoso que dividamos nuestros comentarios en varias partes.

En primer lugar, nos referiremos al problema clasificatorio. Desde este punto de vista hemos admitido, en principio, tres tipos de estafilococo: *Staphylococcus aureus,* S. *epidermidis* y S. inclasificable. El criterio para tal clasificación, en lo que se refiere a los dos primeros, es el establecido en el manual de Bergey (6), y, con arreglo a él, de las 275 cepas estudiadas, 267 (97,1 por ciento) fueron clasificables, mientras que sólo 8 (2,9 por ciento) no pudieron incluirse en ninguno de los dos tipos. Para éstos adoptamos el término de «inclasificables», tal

Cuadro 1. Tipos de estafilococos

Prueba	Distribución		*Staphylococcus aureus*							*Staphylococcus epidermidis*								*Staphylococcus* inclasificable		
			1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7	8	1	2	3
Coagulasa			+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	—
Manitol			+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+
Pigmento			+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	+
Hemolisina			+	+	+	+	—	—	—	—	—	+	+	+	—	+	—	+	+	+
Fosfatasa			+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—
Gelatinasa			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Penicilinasa			+	+	—	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+	+
	Fábrica		25	1	0	1	0	0	0	9	1	2	7	46	0	1	0	3	4	0
	Colegios		36	1	16	0	0	1	2	0	0	18	5	12	5	1	3	0	0	0
	Hospital	Personal	7	1	0	0	1	1	0	0	9	0	2	7	2	0	0	0	0	0
		Enfermos	8	0	1	0	1	0	0	0	2	1	5	11	0	0	0	0	0	1
		Lesiones estafilocócicas	14	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			90	3	17	1	3	2	2	9	12	21	19	76	7	2	3	3	4	1

y como Schaub y Merrit (49) denominan a aquellas cepas en las que existe discrepancia entre los resultados de la coagulasa y manitol. Sin embargo, en el *cuadro 1*, una simple comparación de las cepas inclasificables con las demás, permite observar cómo, salvo en el manitol, las S. inclasificable$_1$ son semejantes a las S. *aureus*$_1$ (las más frecuentes entre las S. *aureus*) y la S. inclasificable$_2$ a las S. *epidermidis*$_3$ (las más frecuentes entre las S. *epidermidis*). Así, pues, sólo la cepa del grupo S. inclasificable$_3$ parece ser realmente «inclasificable», teniendo la impresión de que en las otras su origen puede deducirse lógicamente.

También de orden clasificatorio es la comprobación de la gran variedad de este germen—18 subgrupos, considerando sólo unas pocas características bioquímicas—, lo cual, como dice Mc Dermott (37), causa a veces la impresión de que cada estafilococo es diferente de todos los demás.

A pesar de todo, si defendemos la clasificación mencionada no es por convencimiento de su realidad taxonómica (51), ni tampoco por su utilidad epidemiológica en el sentido de ser suficiente como para identificar cepas de origen diverso, sino solamente por considerarla básica para un intento de unificar nomenclaturas. Criterio que puede que resulte demasiado pragmático, pero con fines epidemiológicos, es sin duda conveniente.

Gelatinasa

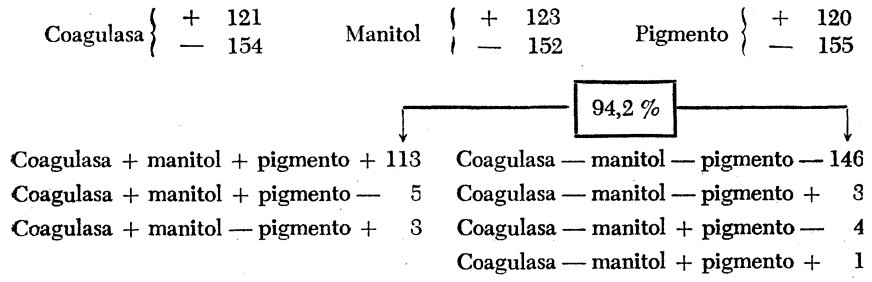
Nuestros resultados (100 por ciento de casos positivos) están en desacuerdo numérico con los de Borchardt (12) y Gordon (23), y cualitativo, es decir, de relación con la especie, con los de Dudgeon (18) y los de Winslow y colaboradores (62). Por el contrario, coinciden con los de Kutscher y Konrich (34), Klopstock y Bockenheimer (32), Fraenkel y Baunman (21) y Griffith y colaboradores (27), lo que nos hace pensar, al igual que Cowan (15), que la producción de tal enzima no tiene valor clasificatorio, no estando en relación con la presencia o ausencia de otras características bioquímicas (42 y 53), con lo que, en consecuencia, no parece lógico ligarla con la resistencia a los antibióticos o la patogenicidad de una cepa.

Fermentación de manitol

En nuestras 260 cepas de portadores sanos—al menos, aparentemente—la coincidencia entre esta prueba y la producción de coagulasa se ha producido en 252 (96,9 por ciento) y, por otra parte, además, en las 15 estafilococias estudiadas, el paralelismo fue del 100 por ciento. Aceptamos, pues, la importancia taxonómica que le ha sido concedida (6), y si bien por sí sola no resuelve grandes incógnitas epidemiológicas, y aunque no sea, como han pretendido algunos autores (1, 30 y 55), responsable directo de la patogenicidad de una cepa, no puede negarse la coincidencia de su positividad con la de la coagulasa, concluyendo, por lo tanto, en la necesidad de su realización al estudiar cualquier estafilococo.

Respecto al pigmento podríamos hacer comentarios muy semejantes a los acabados de mencionar. Nos lo justificaría la cifra de 251 cepas con resultados paralelos al de la coagulasa, frente a las 252 obtenidas con la prueba del manitol. Paralelismo que también ha sido del 100 por ciento en los estafilococos procedentes de lesión.

En el esquema siguiente podemos fácilmente comprobar la similitud en los resultados obtenidos:



Estos resultados están de acuerdo con los de algunos autores (9 y 25) y difieren en ciertos matices con los de otros (17 y 44). Ahora bien, a pesar de todo ello, por haber aceptado el criterio clasificatorio del manual de Bergey (6), y teniendo en cuenta que las cepas discordantes no son las mismas para ambas pruebas, debemos rechazar la producción de pigmento como norma diferencial, con el fin de evitar confusionismos nocivos.

Fijémonos ahora en las sugerencias que nos brindan los resultados de la prueba de control de la *fosfatasa*, enzima posiblemente intrace-

lular (19) y cuya presencia en un cultivo de *Staphylococcus aureus* fue demostrada por primera vez por Gordon y Cooper en 1932 (24). De las 275 cepas de nuestro trabajo, 240 (37,2 por ciento) han sido fosfatasopositivas, lo que representa una cifra mucho más alta que las correspondientes a las características ya estudiadas (pigmento, 120; manitol, 123). En un estudio comparativo, dichos resultados podríamos agruparlos según el *cuadro 2.*

Cuadro 2

Grupo	Prueba	Número de cepas	Fosfatasopositiva Número de cepas	Fosfatasonegativa Número de cepas
I	Coagulasa +	121	120	
	Manitol +	123	121	
	Pigmento +	120	115	
	S. aureus	118	117	
	Coagulasa, manitol y pigmento +	113	112	
II	Coagulasa —	154		34
	Manitol —	152		33
	Pigmento —	155		30
	S. epidermidis	149		33
	Coagulasa, manitol y pigmento —	146		30

Respecto al grupo I estamos, pues, en perfecto acuerdo con lo señalado, entre otros, por Barber y colaboradores (2), Carrere y Roux (13), Pérez y Gallardo (41), Elek (19), etc. Es decir, prácticamente, en todos los casos en que pudo comprobarse la presencia de coagulasa se detectó paralelamente producción de fosfatasa.

No podemos, en cambio, decir lo mismo en cuanto a los resultados del grupo II. Algunos de los autores citados (2 y 19), afirman que un porcentaje elevadísimo—más del 90 por ciento—de las cepas con negatividad de la coagulasa son fosfatasonegativas. Nosotros, sin embargo, con la técnica y medios utilizados por uno de ellos (5) hemos obtenido una cifra muy diferente: 22,1 por ciento. Todo esto nos permite señalar cómo, en nuestra experiencia, y al menos con la técnica mencionada, el hallazgo de una cepa fosfatasonegativa nos ha autorizado

a sospechar, casi con seguridad, que se trataba de un *Staphylococcus epidermidis,* mientras que, por el contrario, su positividad no equivalió a que tal cepa fuera un S. *aureus.*

Otro tipo de resultado nuestro, que confirma los de Zangaglia (63), es la imposibilidad de determinar un grupo especial de bacteriófagos (véase más adelante: Tipificación por bacteriófagos) que pudiera estar en relación primordial con la existencia de esta enzima.

Por último, nuestras experiencias están en desacuerdo con los trabajos de Gillisen y Ruda (22) en cuanto a proporcionalidad entre cuantía de la resistencia de una cepa a la penicilina y su positividad de fosfatasa. En este sentido, ha sido determinado el grado de resistencia de las distintas cepas a la penicilina y podemos señalar la existencia con cierta frecuencia, de cepas resistentes que no produjeron fosfatasa y, la inversa, cepas fosfatasopositivas absolutamente sensibles.

Hemolisina

El número de casos en los que pudimos comprobar, en placas de agar + sangre, un halo de hemolísis alrededor del crecimiento del germen, fue de 237 (86,1 por ciento).

Diferenciando nuestros resultados, como hicimos antes, en dos grupos, según la positividad o negatividad de las otras propiedades, tendremos el *cuadro 3.*

Cuadro 3

Grupo	Prueba	Número de cepas	Hemolisino-positiva, número de cepas	Hemolisino-negativa, número de cepas
I	Coagulasa +	121	114	
	Manito +	123	116	
	Pigmento +	120	112	
	S. aureus	118	111	
	Coagulasa, manitol y pigmento +	113	108	
II	Coagulasa —	154		31
	Manitol —	152		31
	Pigmento —	155		30
	S. epidermidis	149		31
	Coagulasa, manitol y pigmento —	146		28

Considerando, en principio, al grupo I como el de patógenos, y limitándonos a las cepas productoras de coagulasa, por ser las más representativas y, en definitiva, con una cifra muy comparables a las demás del grupo, vemos cómo entre ellas el porcentaje de positividad hemolítica fue de un 94,2, muy parecido al dado por Elek y Levi (20), y en el que, sin embargo, se comprueba la existencia de cepas para las que su capacidad de coagular el plasma no equivale indefectiblemente a presuponerlas poseedoras de la α-lisina. En cuanto a que este pequeño porcentaje represente mutantes ya existentes tras un primer pase (19), no deja de ser una sugestiva hipótesis.

También en el grupo II la relación entre el número de cepas hemolisinonegativas y el número de negatividades en otras propiedades es francamente baja (20 por ciento). Sin embargo, hay que tener en cuenta que la técnica realizada por nosotros se hizo sin neutralización antitóxica oportuna, por lo que sólo pudimos comprobar un tanto inespecíficamente la presencia de hemólisis.

Finalmente, y aunque en nuestro trabajo no se haya realizado una técnica estrictamente adecuada para ello, no nos da la impresión de que exista proporcionalidad entre la cuantía de hemólisis y el grado de resistencia, tal y como la describen Oehring y Funk (39).

Coagulasa

Hoy por hoy representa la propiedad conocida más importante en el estudio de la patogenicidad estafilocócica. El ser básica en la clasificación que hemos aceptado (6) ha hecho que indirectamente la hayamos tenido como referencia al hablar de todas las pruebas anteriores, por lo que nos dispensa ahora de repeticiones innecesarias. Solamente nos interesa, por ser precisamente la prueba más importante, considerar su distribución según los diferentes orígenes de población, y en este sentido nos encontramos con un 30 por ciento de razas positivas en *fábrica,* un 56 por ciento en *colegios* y un 41,6 por ciento en *hospital.* Este último porcentaje es, sin embargo, equívoco, ya que a su vez está integrado por los parciales siguientes: 100 por ciento en lesiones estafilocócicas y 33,3 por ciento, tanto en los enfermos de las diversas salas como en el personal sanitario. Estas cifras están de acuerdo con las admitidas generalmente (19, 38 y 46-48), y evidencian, en primer lugar, cómo cuando se investiga la producción de coagulasa en gérmenes re-

cientemente aislados de focos de lesión, la positividad es prácticamente la norma.

Por otra parte, entre los portadores sanos, los niños han sido con mucha mayor frecuencia que los adultos reservorio de coagulasopositivos.

El hecho de unas cepas sensiblemente semejantes en *fábrica* y *hospital* (excluidas las lesiones estafilocócicas) no nos hace creer que ambas estén aumentadas en relación con las de la población general, sino, más bien—considerando otros datos, como la relación con *colegios,* la comparación con los porcentajes de otros autores, etc.—que no parece existir un mayor número de cepas coagulasopositivas en nuestro medio hospitalario que en el resto de la población.

La diferencia de sexo tampoco ha influido en nuestros resultados, ya que en ambos las cifras vienen a ser las mismas.

Cuadro 4. Porcentaje de positividades de las pruebas

Prueba	Fábrica	Colegios	Hospital	Lesiones estafilocócicas
Coagulasa +	30,0	56,0	33,3	100,0
Manitol +	31,0	56,0	35,0	100,0
Pigmento +	30,0	56,0	33,3	100,0
Hemolisina +	90,0	92,0	73,3	93,7
Fosfatasa +	82,0	91,0	86,6	100,0
Gelatinasa +	100,0	100,0	100,0	100,0
Penicilinasa +	97,0	56,0	91,6	100,0
Número de cepas	100	100	60	15

En el grupo *colegios,* da la impresión de que en los centros privados el número de *Staphylococcus aureus* es menor que en las escuelas públicas, y ello quizá debido a las mejores condiciones higiénicas y sanitarias, tanto de las instalaciones escolares como de las familias de los alumnos.

Ninguna diferencia apreciable, en el sentido que estamos hablando, hemos podido observar en las diferentes secciones de *fábrica.*

El *cuadro 4* no necesita ningún comentario especial y lo presentamos solamente con el ánimo de facilitar la comparación de las cifras de positividades, según el grupo originario de las cepas.

Tipos de estafilococos hallados

En el *cuadro 1* pueden verse las distintas especies y subgrupos que hemos hallado en nuestras 275 cepas, así como también una relación numérica de cada uno de ellos, según su origen.

Epidemiológicamente hablando, se observa en conjunto una distribución lógica y homogénea, separándose, no obstante, de esta tónica: a) el que todos los *epidermidis*$_1$ pertenezcan a *fábrica*; b) el que 11 de un total de 12 *epidermidis*$_2$ sean de *hospital,* y c) el que los inclasificables, ya lo hemos citado antes, sean prácticamente todos (7/8) también de *fábrica.* Otros subgrupos, tales como el S. *aureus*$_5$, S. *aureus*$_7$ y S. *epidermidis*$_8$ parecen mostrar cierta selectividad, pero sus cifras son muy pequeñas y no permiten sacar conclusiones. Ahora bien, el que todos estos fenómenos distributivos obedezcan o no a condiciones ambientales específicas, es algo que desconocemos, pero pensamos que puede ser más probable culpar del hecho a la contagiosidad del germen que al condicionamiento de la variación por factores ambientales determinados.

Tipificación por bacteriófagos

Como colofón a lo que acabamos de decir sobre los diversos tipos de gérmenes hallados, damos en el *cuadro* 5 un esquema, según normas

Cuadro 5. *Presencia de los distintos patrones de bacteriófagos*

Grupo	Fábrica	Colegios	Hospital	Total
I	9	23	5	37
II	3	5	7	15
III	5	5	8	18
IV	0	0	0	0
Otros	10	5	8	23
No tipificables	3	18	7	28

de la OMS del año 1961 (9), de los patrones encontrados en nuestras 121 cepas coagulasopositivas. En él consignamos, junto a los grupos clásicos, el que hemos denominado «otros», sólo, naturalmente, con el fin de simplificar y encuadrar en él los tipificables por bacteriófagos especiales.

De la observación del *cuadro* 5 deducimos, en primer lugar, la gran variedad de patrones, lo que nos indica la limitación de su eficacia como procedimiento clasificatorio (7, 19 y 58).

Por otro lado, no vemos posible destacar una marcada predilección por ningún tipo en ninguna de las poblaciones estudiadas, de no ser esa falta de estafilococos tipificables por el bacteriófago del IV. Sin embargo, se puede observar un elevado número de cepas no tipificables por ningún bacteriófago conocido y la ausencia de una mayor proporción de resistentes a los antibióticos en el grupo III (45 y 60).

Respecto a los posibles 10 tipos virulentos descritos por Williams y colaboradores (64), si bien las condiciones y número de gérmenes de nuestro trabajo no son los más adecuados para ello, no hemos podido confirmarlos. De la misma manera, tampoco el porcentaje de aparición del 80/81 (4, 8, 33, 50 y 56) ha sido de tan claro predominio entre las cepas provenientes de lesiones activas.

Finalmente, a nuestro entender, no es posible concretar ninguna relación entre patrón de bacteriófagos y cualquier otra de las propiedades bioquímicas o de resistencia a los antibióticos (12, 17, 35, 40, 44 y 59).

En resumen, creemos que la lisotipia puede resultar muy útil para establecer la identidad de cepas en el curso de un brote epidémico, pero por sus dificultades técnica y de interpretación y su elevado coste, no permite, por ahora, su accesibilidad a muchos centros, representando, sin embargo, dentro del campo de la investigación, una de las directrices más prometedoras.

Penicilinasa

Un 81,09 por ciento (223 cepas) de nuestros estafilococos fueron penicilinasopositivos. Naturalmente, este porcentaje tan elevado no corresponde a una realidad generalizable para nuestro ambiente. Hay que tener en cuenta los orígenes de las muestras a fin de no sacar erróneas conclusiones.

Analizando este porcentaje promedio vemos que cuando las cepas provienen de *fábrica* su valor es de un 97 por ciento, mientras que para *colegios* queda en un 56 por ciento. Observamos aquí ya un hecho interesante: la población no hospitalaria, incluso tratándose de niños que son los más frecuentemente portadores de razas coagulasopositivas, presentan un tanto por ciento de productoras de penicilinasa muy inferior al de los trabajadores de una empresa de fabricación de penicilina. Esto que mostramos—por otra parte, lógicamente vaticinable—puede tener importancia epidemiológica, denunciando la presencia de un vector más en la sociedad de cepas resistentes a la terapéutica penicilínica.

Las cifras en *hospital* han sido: 90 por ciento entre el personal sanitario, 93,3 por ciento entre los enfermos, y un 100 por ciento en las lesiones estafilocócicas. Si descartamos éstas, por no ser representativas del medio hospitalario, veremos que el porcentaje de dicho centro sanitario es de 91,6 por ciento, cifra alta, pero inferior todavía a *fábrica* (97 por ciento).

En cuanto a la distribución de estas cepas según la especie, nos encontramos con que un 83,9 por ciento entre los *Staphylococcus aureus* y un 77,8 por ciento entre los S. *epidermidis* produjeron penicilinasa. Existe, pues, un ligero predominio de los S. *aureus*, como se admite en general.

Si consideramos ahora la producción de penicilinasa frente a la resistencia a la penicilina demostrada *in vitro*, y teniendo en cuenta que hemos definido como resistente al germen capaz de crecer en un caldo en presencia, por lo menos, de 1 U.I./cm^3, nos encontramos con los resultados recogidos en el *cuadro 6*.

Cuadro 6

Grupo	Número de cepas	Penicilinasa	Resistencia
I	193	+	+
II	59	—	—
III	23	+	—
IV	0	—	+

Este cuadro nos muestra, ante todo, la natural coincidencia entre producción de enzima y capacidad de resistencia. Los 23 casos del grupo III, productores todos de penicilinasa, fueron incapaces de crecer en 1 U.I./cm^3, pero, sin embargo, se reprodujeron manifiestamente con concentraciones de 0,25 y 0,50 U.I./cm^3. En el grupo IV no hemos podido incluir ninguna de las 275 cepas, lo cual indica que la enzima producida es, por lo menos, extracelular. Una sola cepa, incluida en este grupo por ser sensible a 1 U.I./cm^3, mostró crecimiento con concentraciones de 0,25 y 0,50 U.I./cm^3, y, sin embargo, no pudimos encontrar en ella la menor producción de penicilinasa.

Resistencia a los antibióticos

Consideradas globalmente *(cuadro 7)* las cifras de cepas resistentes —para el caso de la penicilina, un 72,7 por ciento, y para la estreptomicina, un 48 por ciento—significan porcentajes demasiado elevados si se les va a estimar representativos de lo que ocurre con nuestra población general. No olvidemos que la procedencia de las cepas ha sido de lugares donde se encuentran, con mucho, las cifras más altas.

Por el contrario, y aun a pesar de ello, los porcentajes correspondientes a neomicina (22,9 por ciento), y aún más, a tetraciclina (14 por ciento), son inferiores a los de publicaciones de otros países (11, 16, 26, 36, 43, 52 y 64), lo que está de acuerdo con la menor frecuencia terapéutica con que estos antibióticos han sido empleados en Navarra (período de 1958-1962).

Refiriéndonos a las cepas coagulasopositivas, por ser las de mayor interés clínico, diremos que sus porcentajes de resistencia a penicilina (74,3 por ciento) y estreptomicina (50,4 por ciento) han sido prácticamente los mismos que los generales, lo que viene a decir que esta propiedad de producir coagulasa no parece guardar relación con la sensibilidad a los antibióticos. No nos ha ocurrido lo mismo con tetraciclina y neomicina. Un 8,3 por ciento de las coagulasopositivas frente a un 19,5 por ciento de las negativas fueron resistentes a tetraciclina, y, por otra parte, un 41,3 por ciento de las primeras fueron resistentes a neomicina, frente a sólo un 8,4 por ciento de los *Staphylococcus epidermidis*. Naturalmente que con estas cifras no podemos concluir en la existencia de una íntima relación entre coagulasa y sensibilidad a estos antibióticos, pero su comprobación la juzgamos interesante, ya que no nos parece convincente atribuirlo al azar.

Cuadro 7. Cepas resistentes

Antibiótico	Fábrica		Colegios		Hospital		Lesiones estafilocócicas		Total	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Penicilina	88	88,0	46	46,0	53	88,3	13	86,6	200	72,7
Estreptomicina	42	42,0	38	38,0	43	71,6	9	60,0	132	48,0
Tetraciclina	2	2,0	3	3,0	32	53,3	3	20,0	40	14,5
Neomicina	24	24,0	25	25,0	9	15,0	5	33,3	63	22,9

Comparando los diversos grupos estudiados, observamos un paralelismo entre el número de resistentes a estreptomicina, tetraciclina y neomicina de *fábrica* y *colegios* (42,2 y 24 por ciento, frente a 38,3 y 25 por ciento, respectivamente). El paralelismo se rompe en la penicilina: *fábrica,* 88 por ciento; *colegios,* 46 por ciento. Estos resultados nos permiten comprobar que precisamente la disparidad ocurre únicamente con el antibiótico que en aquella fecha se fabricaba ya en la Empresa. Por lo demás, la distribución, como es lógico, es semejante.

El grupo del *hospital,* por su parte, muestra un porcentaje de resistencia a penicilina de 88 por ciento, sensiblemente el mismo que el de la *fábrica* y, sin embargo, los de estreptomicina y tetraciclina fueron mucho más elevados (71,6 y 56,3 por ciento, respectivamente). Llama la atención que el número de resistentes a neomicina en este grupo sea el más bajo de los tres.

Patrones de sensibilidad

Un tanto análogamente a lo establecido por Barber y Burston (3) hemos estudiado los diferentes patrones de sensibilidad de nuestras

Cuadro 8. Patrones de sensibilidad

Patrón				Fábrica			Colegios			Hospital			Lesiones estafilocócicas		
P	E	T	N	S.a.	S.e.	S.i.	S.a.	S.e.	S.i.	S.a.	S.e.	S.i.	S.a.	S.e.	S.i.
R	S	S	S	8	30	3	11	4	—	3	8	—	4	—	—
S	S	S	S	3	7	—	13	28	—	1	2	—	1	—	—
R	R	S	S	4	19	—	5	4	—	3	4	—	3	—	—
R	R	S	R	6	7	2	13	—	—	2	—	—	2	—	—
R	R	R	S	—	2	—	—	3	—	2	22	1	1	—	—
R	S	S	R	6	—	1	5	1	—	1	—	—	1	—	—
S	R	S	S	—	—	—	4	3	—	2	1	—	1	—	—
S	R	S	R	—	1	1	5	1	—	1	—	—	—	—	—
R	R	R	R	—	—	—	—	—	—	5	—	—	2	—	—
R	S	R	S	—	—	—	—	—	—	—	2	—	—	—	—

P = penicilina. E = estreptomicina. T = tetraciclina. N = neomicina. R = resistente. S = sensible. S.a. = *Staphylococcus aureus.* S.e. = *S. epidermidis.* S.i. = S. inclasificable.

cepas, hallando 10 tipos diferentes sobre un máximo posible de 16. La enumeración que hacemos de ellos en el *cuadro 8* es por orden de mayor a menor frecuencia, teniendo en cuenta el lugar de procedencia de las cepas.

En este cuadro se observa la semejanza evidente entre *fábrica* y *colegios,* si exceptuamos la inversión de frecuencia en los dos primeros patrones y la discrepancia en el séptimo—SRSS—, ambas cosas lógicas, por el ambiente penicilínico de la Empresa. En las dos poblaciones, los patrones más frecuentes son los altamente sensibles a los antibióticos, y también el porcentaje de resistencia a tres antibióticos es prácticamente el mismo.

En *el hospital.* el panorama es casi opuesto. El más frecuente es el RRRS, siendo sólo de un 3 por ciento el SSSS.

No nos parece que exista un determinado patrón que pueda considerarse específico ni de los *Staphylococcus aureus* ni de los S. *epidermidis.* En ambas especies se dan ejemplos de todos los patrones hallados, salvo el RRRR en los S. *epidermidis* y el RSRS en los S. *aureus.* Comparativamente, sin embargo, quizá pueda sospecharse una mayor proporción, entre las cepas de S. *epidermidis,* de gérmenes fundamentalmente sensibles a los antibióticos habituales, tal y como se ha señalado por algunos autores. Los tres primeros patrones de nuestro cuadro parecen confirmarlo.

Multidiscos

Con el procedimiento de los discos se han obtenido unos resultados *(cuadro 9)* que, en líneas generales, muestran cómo, cuando se utilizan técnicas correctas y discos en buenas condiciones y de garantía, existe buena correlación con los obtenidos por el procedimiento de diluciones seriadas. Debemos señalar que en nuestro caso las diferencias que se observan para la neomicina entre ambas técnicas se deben a las distintas concentraciones empleadas.

Con los otros seis antibióticos—bacitracina, cloranfenicol, eritromicina, novobiocina, oleandomicina y polimixina—se evidencia fácilmente la conocida resistencia estafilocócica a este último y la gran importancia del ambiente (100 por ciento de sensibilidades) para la aparición frecuente de cepas resistentes.

Cuadro 9. Cepas coagulasopositivas sensibles a los antibióticos

Antibiótico	Fábrica		Colegios		Hospital		Lesiones estafilocócicas	
	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
Bacitracina, 5 U.I.	30	100,0	56	100,0	20	100	15	100,0
Cloranfenicol, 10 γ	30	100,0	56	100,0	20	100	14	93,3
Eritromicina, 10 γ	30	100,0	56	100,0	20	100	15	100,0
Estreptomicina,10 γ	22	73,3	41	73,2	8	40	7	46,6
Neomicina, 10 γ	30	100,0	56	100,0	20	100	15	100,0
Novobiocina, 5 γ	30	100,0	56	100,0	20	100	15	100,0
Oleandomicina, 5 γ	30	100,0	56	100,0	20	100	15	100,0
Penicilina, 1,5 U.I.	0	0,0	16	28,5	2	10	1	6,6
Polimixina, 10 γ	0	0,0	0	0,0	0	0	0	0,0
Tetraciclina, 10 γ	30	100,0	56	100,0	13	65	11	73,3

Sensibilidad de las cepas de fábrica en los años 1958 y 1962

Veamos finalmente en doce portadores tomados al azar entre el personal de la Empresa, un estudio comparativo de sus cepas en los años 1958 y 1962. Durante este intervalo y junto con la penicilina que ya venía fabricándose, se han producido industrialmente estreptomicina y tetraciclina, con lo que en los resultados es posible comprobar la influencia sobre la biología del estafilococo, de un «medio» modificado *(cuadro 10)*.

Vemos en este cuadro cómo en relación con las tres propiedades bioquímicas, las positividades y negatividades en ambas fechas se corresponden en gran proporción (75 por ciento). En nuestra opinión, esto puede significar que, o bien se trata de los mismos gérmenes, correspondiendo las diferencias a mutaciones clásicas, o bien son gérmenes distintos que presentan las mismas características por pertenecer a los tipos de estafilococo más frecuentes. Puede suponerse también que las propiedades del terreno en donde residen, es decir, los portadores, condicio-

nan, por lo menos parcialmente, sus características. De todas formas, como veremos en seguida, observamos cómo a pesar de las grandes diferencias en cuanto a sus patrones de sensibilidad, éstas no se han hecho sentir en lo demás, permitiéndonos sospechar que la adquisición de resistencia a los antibióticos no presupone cambios específicos en su producción de coagulasa, pigmentación o fermentación del manitol.

Lo que llama más la atención en el cuadro es el cambio absoluto

Cuadro 10. Comparación de 12 cepas de fábrica

Número de la cepa	1958							1962						
	Co	Ma	Pi	P	E	T	N	Co	Ma	Pi	P	E	T	N
2	—	—	—	R	R	S	S	—	—	—	S	R	R	S
11	+	+	+	R	S	S	R	+	+	+	R	R	R	S
17	—	—	—	R	S	S	S	—	—	—	R	R	R	S
25	—	—	—	R	R	S	S	—	—	—	R	R	R	S
39	+	+	—	R	S	S	R	—	+	+	R	R	R	S
52	—	—	—	R	R	S	R	—	—	—	R	R	R	S
56	+	+	+	R	R	S	S	—	—	—	R	R	R	S
62	+	+	+	R	R	S	R	—	—	—	R	R	R	S
66	+	+	+	R	R	S	R	+	+	+	R	R	R	S
67	—	—	—	R	S	S	S	—	—	—	R	R	R	S
75	—	—	—	R	R	R	S	—	—	—	R	R	R	S
76	—	+	—	S	R	S	R	—	—	—	R	R	R	S

Co = coagulasa. Ma = manitol. Pi = pigmento. P = penicilina. E = estreptomicina. T = tetraciclina. N = neomicina.

en los patrones de sensibilidad. En penicilina no existe tal cambio (persiste el mismo número de cepas resistentes), debido a que en 1958 se producía ya en fábrica.

Sin embargo, en estreptomicina, nuestras 12 cepas de comparación resultaron resistentes el año 1962. Cuatro años antes lo eran ya un 66,6 por ciento de ellas, mostrándonos, puesto que aún no era fabricada en la Empresa, su menor actividad frente al estafilococo, y tam-

bién el que para entonces era ya un antibiótico muy utilizado en la terapéutica habitual.

Donde este aumento de porcentaje se hace impresionante es en el caso de la tetraciclina. Sólo una de las 12 era resistente en 1958, lo que equivale a un 8 por ciento, aproximadamente, valor que daríamos por más probable si no tuviésemos el dato real del 2 por ciento que vimos antes *(cuadro 7)*. Es decir, el incremento de cepas resistentes a la tetraciclina ha sido desde un 2 a un 100 por ciento, aproximadamente, ya que es posible que si hubiéramos investigado todas ellas en lugar de las 12, al azar, hubiera aparecido alguna sensible. Teniendo en cuenta que la tetraciclina empezó a producirse en la Empresa en enero de 1962, quiere decirse que fundamentalmente el cambio se operó en el plazo de seis meses, ya que estas pruebas las realizamos en junio de este mismo año. Naturalmente, este dato de tiempo no es exacto, debido en parte a que quizá, si las experiencias se hubieran verificado antes, los resultados podrían haber sido similares, y también a que es probable que el valor del 2 por ciento hubiese aumentado durante los años del 1958 al comienzo del 1962, a causa de un mayor empleo de dicho antibiótico en la terapéutica. De todas formas, la cuantía del incremento supera con mucho lo teórico de esta posibilidad y, además, el plazo máximo de seis meses es lo suficientemente corto como para evidenciar la rapidez del desarrollo de resistencia cuando el ambiente está masivamente impregnado de antibiótico.

Tan espectacular, aunque de sentido contrario, es el hecho ocurrido con la resistencia a neomicina. Según vemos en el *cuadro 10,* en el año 1958, un 50 por ciento de las cepas eran resistentes a 1 U.I./cm^3 de dicho antibiótico. Nosotros sabemos que en el total del grupo de *fábrica,* este porcentaje era en realidad de un 24 por ciento. En junio de 1962, ninguna de las 12 cepas contrastadas dio evidencia de resistencia. Si la circunstancia de no producirse en la Empresa y el hecho de no tratarse de un antibiótico muy usado en la clínica habitual justifican el que la cifra de resistentes no aumentara, hemos de reconocer que la regresión hasta cero, o quizá a valores muy pequeños, es algo que sin duda nos sorprende y cuya importancia hace que pensemos en ello para nuestros próximos trabajos sobre estafilococos.

AGRADECIMIENTO

Damos las gracias a la Dirección de Penibérica, S. A., por habernos facilitado medios y personal ayudante; al «Public Health Laboratory Service», de Londres, por su colaboración al verificar la tipificación de nuestras cepas por bacteriófagos, y a las señoritas María Paz Miqueleiz y María José Sagüés por la paciente realización manual de todas las pruebas.

RESUMEN

En 275 cepas de origen diverso (personal de una fábrica de antibióticos, colegios de enseñanza, hospital y lesiones activas) se estudian algunas propiedades bioquímicas (coagulasa, manitol, pigmento, fosfatasa, hemolisina, gelatinasa y penicilinasa) junto con la tipificación por bacteriófagos de las 121 coagulasopositivas, y el espectro de sensibilidad del total frente a 10 antibióticos.

A pesar de la variedad de razas encontradas, se confirma la utilidad de la clasificación del género *Staphylococcus* en S. *aureus* y S. *epidermidis*. El paralelismo de positividades de las pruebas de coagulasa, manitol y pigmento fue evidente (94,2 por ciento), pero, sin embargo, este último no debe ser considerado como de valor clasificatorio ni de nomenclatura. Entre los S. *epidermidis*, sólo un 22,1 por ciento fue fosfatasonegativo y un 20 por ciento hemosilinonegativo. No se ha encontrado ningún valor epidemiológico a la prueba de la gelatinasa.

Salvo la absoluta proporción (100 por ciento) de coagulasopositivas en lesiones estafilocócicas y una mayor proporción de estas cepas en niños (56 por ciento), no se ha observado ninguna relación entre tipo de estafilococo y origen de población. Igualmente, tampoco se ha visto relación entre patrón de bacteriófagos y origen de población o resistencia a los antibióticos.

Prácticamente, un 100 por ciento de las cepas fue sensible a los antibióticos poco utilizados en nuestra terapéutica; en el caso de los habituales (penicilina, estreptomicina y tetraciclina), las cepas hospitalarias fueron mucho más resistentes que las de colegios. Sin embargo, se ha comprobado cómo, conforme se ponían en marcha los procesos de fabricación de estos antibióticos, el personal de la Empresa se iba

haciendo resistente, hasta superar con mucho a las cifras de las hospitalarias. Se señala la posible importancia de este vector de cepas resistentes. El desarrollo de resistentes no se acompaña de modificaciones significativas en las pruebas de coagulasa, manitol y pigmento.

SUMMARY

In 275 strains of various sources (employers of an antibiotic plant, schoolboys, hospital, and active lesions) some biochemical characteristics (coagulase, mannitol, pigment, phosphatase, hemolysin, gelatinase, and penicillinase) are studied. At the same time phage typing of 121 coagulase-positive and sensitivity of all strains to 10 antibiotic are controlled.

In spite of the large variety of strains been found the usefulness of the classification of the genus *Staphylococcus* is confirmed. It was evident the parallelism between coagulase, mannitol, and pigment positivities (94.2 per cent); but, however, the latter test should not be considered as a classifying characteristic. Among the S. *epidermidis* only a 22.1 per cent was phosphatase-negative and a 20 per cent hemolysin-negative. Gelatinase test was of no epidemiologic interest.

It has been observed no relation between type of *Staphylococcus* and population origin, except the absolute proportion (100 per cent) of coagulase-positive in staphylococcal lesions and a higher incidence in children (56 per cent). Similarly, no relation between phage pattern and population origin or antibiotic resistance has been found.

Nearly a 100 per cent of strains was sensitive to antibiotics of minor use in our therapeutic; with the common ones (penicillin, streptomycin, and tetracyclin), hospital strains were much more resistant than those of colleges. Nevertheless, it has been seen how, soon after starting the manufacture of these antibiotics, the employers of the factory were becoming resistant, exceeding largely the figures of hospital strains. It is pointed out the possible importance of this vector of resistant strains. Development of resistance is not accompanied by significative modifications in coagulase, mannitol, and pigment tests.

BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, J. H., y FELLOWES, O. N. 1940. *En* ELEK, 68.
2. BARBER, M., y colaboradores. 1951. J. Pathol. Bacteriol., 63, 57.
3. BARBER, M., y BURSTON, J. 1955. Lancet, 2, 578.
4. BARBER, M., y DUTTON, A. A. C. 1958. Lancet, 2, 64.
5. BARBER, M., y KUPER, S. W. A. 1951. J. Pathol. Bacteriol., 63, 65.
6. BERGEY's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. 7.ª edición. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.
7. BLAIR, J. E. 1958. Bull. World Health Organ., 18, 291.
8. BLAIR, J. E., y CARR, M. 1960. Science, 132, 1.247.
9. BLAIR, J. E. y WILLIAMS, R. E. O. 1961. Bull. World Health Organ., 24, 771.
10. BONIECE, W. S., y colaboradores. 1957. J. Bacteriol., 73, 685.
11. BONI, A., y CARAFA, V. 1959. Gazz. Intern. Med. Chir., 64, 1.235.
12. BORCHARDT, K. A. 1958. Antibiot. Chemotherapy, 8, 564.
13. CARRERE, L., y ROUX, J. 1954. Ann. Inst. Pasteur, 87, 349.
14. CHRISTIE, R., y KEOGH, E. V. 1940. J. Pathol. Bacteriol., 51, 139.
15. COWAN, S. T. 1938. J. Pathol. Bacteriol., 46, 31.
16. D'AGATA, A. 1958. Giorn. Mal. Infettive Parassit., 10, 550.
17. DI SALVO, A. F. 1960. Antibiot. Chemotherapy, 6, 349.
18. DUDGEON, L. S. 1908. *En* TOPPLEY y WILSON, 703.
19. ELEK, S. D. 1959. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E. and S. Livingstone, Londres.
20. ELEK, S. D., y LEVY, E. 1950. *En* ELEK, 236.
21. FRAENKEL, C., y BAUNMANN, 1905. *En* TOPPLEY y WILSON, 703.
22. GILLESEN, G., y RUDA, M. 1958. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I. Orig., 171, 281.
23. GORDON, M. H. 1903-4. *En* TOPPLEY y WILSON, 703.
24. GORDON, J., y COOPER, K. E. 1932. Brit. J. Exptl. Pathol., 13, 503.
25. GREER, J. E. 1956. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 56, 98.
26. GRIFFITH, L. J., y OSTRANDER, W. E. 1959. Antibiot. Chemotherapy, 7, 417.
27. GRIFFITH, R. S., y colaboradores. 1957-58. Antibiot. Ann., 370.
28. GROVE, D. C., y RANDALL, W. A. 1955. Assay Methods of Antibiotics. Medical Encyclopedia, Inc., Nueva York.
29. GRÜN, L. 1959. Zentr. Bakteriol. Parasitenk., Abt. I. Orig., 174, 184.
30. HINE, T. G. M. 1922. *En* ELEK, S. D., 68.
31. HUGH, R., y LEIFESON, E. 1953. J. Bacteriol., 66, 24.
32. KLOPSTOCK y BOCKENHEIMER. 1904. *En* TOPPLEY y WILSON, 703.
33. KOCH, M. L., y colaboradores. 1959. Antibiot. Chemotherapy, 9, 409.
34. KUTSCHER, y KONRICH, F. 1904. *En* TOPPLEY y WILSON, 703.
35. LEVY, E., y colaboradores, 1953. J. Gen. Microbiol., 9, 97.
36. MANN, P. H. 1959. Antibiot. Chemotherapy, 12, 755.
37. MCDERMOTT, W. 1956. Ann. N. Y. Acad. Sci., 65, 59.
38. NAHMIAS, A. J., y EICKHOFF, T. C. 1961. New Engl. J. Med., 265, 74.

39. OEHRING, H., y FUNK, G. 1961. Arch. Hyg. Bakteriol., 145, 376.
40. PAN, J., y BLUMENTHAL, H. J. 1961. J. Bacteriol., 66, 24.
41. PÉREZ, A., y GALLARDO, R. 1959. Ciencia (Mex.), 19, 29.
42. RICHOU, R., y colaboradores. 1952. *En* ELEK, 288.
43. RODZINSKI, L., y MACIASZCK, C. 1961. Polski Tygod. Lekar., 16, 486.
44. ROSENBLUM, E. D., y JACKSON, J. L. W. 1957. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 887.
45. ROUNTREE, P. M. 1953. Lancet, 1, 514.
46. ROUNTREE, P. M., y BARBOUR, R. G. H. 1950. Med. J. Australia, 1, 525.
47. ROUNTREE, P. M., y BARBOUR, R. G. H. 1951. J. Pathol. Bacteriol., 63, 313.
48. SAINT-MARTIN, M. 1953. Can. J. Public Health, 44, 324.
49. SCHAUB, I. G., y MERRIT, C. D. 1960. Bull. John's Hopkins Hosp., 106, 25.
50. SHAFFER, T. E., y colaboradores. 1957. Am. J. Public Health, 47, 990.
51. SHAW, C., y colaboradores. 1951. J. Gen. Microbiol., 5, 1.010.
52. SPINK, W. W. 1956. Ann. N. Y. Acad. Sci., 65, 175.
53. SUZUKI, A. 1953. *En* ELEK, 288.
54. The Oxoid Manual. 1961. 2.ª edición. Londres.
55. THYGESON, P. 1938. *En* ELEK, 68.
56. TIMBURY, M. C., y colaboradores. 1958. Lancet, 2, 1.081.
57. TOPPLEY, W. W. C., y WILSON, G. S. 1957. The principles of Bacteriology and Immunity, 4.ª edición. Londres.
58. TORRES PEREIRA, A. 1960. Arquiv. Inst. Bacteriol. Câmara Pestana, 10, 557.
59. WESLEY-JAMES y ALDU. 1961. J. Clin. Pathol., 14, 96.
60. WILLIAMS, R. E. O., y colaboradores. 1953. Lancet, 1, 510.
61. WILLIAMS, R. E. O., y colaboradores. 1959. Brit. Med. J., 2, 558.
62. WINSLOW, C. E. A., y colaboadores. 1920. *En* TOPPLEY y WILSON, 704.
63. ZANGAGLIA, O. 1958. Riv. Ist. Sieroterap. Ital., 32, 248.
64. ZGORNIAK-NOWOSIELSKA, I., y DOLEZAL, M. 1959. Polski Tygod. Lekar. Wiadomosci Lekar, 14, 75.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN" DE MICROBIOLOGIA

ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA MULTIPLICACION DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS DE SAN LUIS CULTIVADO EN CELULAS HELA Y DE AMNIOS HUMANO (*)

por

M.ª DEL PILAR VILAS

INTRODUCCION

El virus de la encefalitis de San Luis ha sido cultivado en células de embrión de pollo (6), de cerebro de embrión de ratón (4, 14-15 y 17), de cerebro de ratón adulto (14), de cerebro de cobayo (9); en células HeLa (13), en explantos de neoplasias de origen humano (10), en células de riñón de hámster (7) y en células de la estirpe Detroit-6 (16). Las dos últimas resultaron las más favorables.

Scherer y Syverton (13) observaron en 1954 que este virus, a pesar de multiplicarse en células HeLa, causa en ellas fenómenos citopáticos poco importantes e irregulares.

A la vista de los resultados obtenidos hasta ahora por las investigaciones realizadas en este campo, todavía existe el problema de conocer con la suficiente exactitud las causas o factores que determinan las irregularidades en la multiplicación de este virus en determinados cultivos celulares.

Por ello hemos considerado de interés contribuir al esclarecimiento de

(*) Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de la autora y ha sido realizado, en unión de otros varios, mediante una Ayuda (FG-Sp-122) del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos.

este problema, aportando los datos obtenidos mediante el estudio de algunos factores que posiblemente tienen relación con dichos fenómenos.

En líneas generales, se ha intentado determinar estos factores estudiando la influencia ejercida sobre las células y los virus por diversos medios de cultivo, pH y temperaturas.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Virus de la encefalitis de San Luis (ESL). Cepa Webster. Título, DLR_{50} (*) $= 10^{2,5}/0,03$ ml, determinado por el método de Reed y Muench (12). La cepa del virus se mantiene activa por sucesivos pases en cerebro de ratón y se conserva liofilizada.

Células

Cepa de células HeLa (procedente de un carcinoma de cuello de útero). Cepa de células de amnios humano (AH) (procedente de amnios humano normal). Ambas cepas (**) se mantienen en continua proliferación.

Animales

Ratones blancos jóvenes, de 18-22 g. Se inoculan por vía intracerebral con 0,03 ml de la suspensión del virus.

Medios de crecimiento

Medio I

Utilizado para el crecimiento de la cepa HeLa. Composición: solución de Hanks, completa, 75 %; solución de hidrolizado de lactoalbúmina (al 5 por ciento, en Hanks), 10 %; suero humano, 15 %; penicilina, 100 U.I./ml; estreptomicina, 100 µg/ml; nistatina, 20 U.I./ml; rojo de fenol (al 0,4 por ciento), 1 %; bicarbonato (al 8,4 por ciento), 1 %. pH, 7,2.

(*) Dosis letal al 50 por ciento, para ratón.

(**) Suministradas por Italdiagnostic (Roma).

Medio VII

Utilizado para el crecimiento de la cepa de amnios humano. Composición: solución de Hanks, completa, 35 %; solución de hidrolizado de lactoalbúmina, 10 %; suero de ternera inactivado a 53 °C, durante treinta minutos, 10 %; extracto de levadura, 0,2 %; penicilina, 100 U.I./ml; estreptomicina, 100 μg/ml; nistatina, 20 U.I./ml; rojo de fenol, 1 %; bicarbonato, 1 %. pH, 7,2.

Medios experimentales

Medio de mantenimiento

Semejante al medio I, pero con 85 % de solución de Hanks y 10 % de suero de conejo, en vez de suero humano.

Medio A

Medio I, con solución de Hanks sin glucosa (85 %) y 15 % de suero de conejo, en lugar de suero humano.

Medio B

Medio I, con 15 % de suero de conejo, en lugar de suero humano.

Medio C

Medio I, sin suero.

Medio D

Medio I, con albúmina bovina (solución al 10 por ciento, en earle), 0,1 %, en lugar de suero humano.

Medio E

Solución de Hanks.

Medio F

Solución de Hanks, sin glucosa.

Medio VI

Solución de earle (10 ×), 9,2 %; albúmina bovina (solución al 10 por ciento, en earle), 1 %; hidrolizado de lactoalbúmina (solución al 5 por ciento, en earle), 10 %; suero de ternera, 1 %; agua bidestilada estéril, hasta 100 ml.

Tripsina

Es utilizada para la tripsinización de los cultivos celulares, a la dilución de 0,1 por ciento. Su preparación se realiza pesando 0,1 g de tripsina Difco 1 : 250, que se disuelve en 100 ml de solución de Hanks, y se ajusta el pH a 7,6. Para obtener la disolución total, se mantiene a 37 °C durante treinta minutos; después, toda la noche en nevera a 4 °C, y finalmente, se conserva a —20 °C.

Método de cultivo de las células

El cultivo de las células se realiza en frascos hexagonales de vidrio pyrex, con una capacidad total de 225 ml. Las células se adhieren y proliferan en la cara que sirve de base. Cuando estas células han formado una capa continua, se retira el medio nutritivo y esta capa continua se somete a la acción de una solución de tripsina al 0,1 por ciento, obteniéndose así una suspensión de células libres. La tripsina se elimina por centrifugación; las células se resuspenden en medio de crecimiento y, después de determinar la proporción adecuada por medio de un hematímetro, se distribuyen en otros frascos para su crecimiento.

EXPERIMENTOS

Termorresistencia del virus

Se diluye el virus al 10^{-1} en medio de mantenimiento a pH 7,2 y se reparte en cinco tubos de cultivo, tapándose herméticamente éstos con tapón de goma; cada uno de los tubos se coloca en estufa a distinta temperatura: 39, 37, 35, 28 y 20 °C, a intervalos de tiempo iguales para todos ellos. Se recogen muestras de los medios con suspensión de virus y cada una de estas muestras se inocula intracerebralmente a lotes de cuatro ratones para comprobar la existencia de virus en la muestra.

Los ratones inoculados se tienen en observación durante quince días, vigilándose su mortalidad.

Este experimento se ha considerado necesario para tener la seguridad en los siguientes, de que no quedaban en el medio partículas del virus inoculado, a partir de determinado período de tiempo, sino solamente el virus liberado por las células.

Influencia de varias temperaturas sobre la infección celular

Se ensayan las siguientes temperaturas: 39, 37, 35, 28 y 20 °C, sobre cultivos infectados sumergidos, en medio de mantenimiento con pH 7,2, realizándose los experimentos de la forma que describimos a continuación.

Se inoculan frascos de cultivos de células de las dos cepas, que tengan formado el epitelio monocelular continuo, siendo la cantidad de virus inoculado en cada frasco de 1.000 DLR_{50}, procedente de cerebro de ratón infectado y conservado por liofilización. Estos frascos inoculados se mantienen en cultivo a las distintas temperaturas ya indicadas, sometiendo también a cada una de ellas un frasco de cada tipo de células en las mismas condiciones, pero sin inocular con virus, para que nos sirvan de testigo del comportamiento de las células sanas a dichas temperaturas.

Dos veces al día, por la mañana y por la tarde, se observa al microscopio el aspecto de los cultivos y la aparición de efectos citopáticos, anotándose todos los datos y manteniéndose los cultivos en observación hasta su casi total destrucción.

La toma de muestras del medio se hace siempre que el cultivo presenta alguna anormalidad y cada vez que es necesario cambiarlo, cosa que se lleva a cabo cuando por el metabolismo celular, dicho medio se hace inadecuado para el cultivo, lo cual se manifiesta por el cambio de color del indicador de pH que contiene el medio al acidificarse éste.

Estas muestras se inoculan intracerebralmente en lotes de cuatro ratones cada una de ellas, para determinar la existencia de virus libre en el medio; los ratones se mantienen en observación durante quince días.

Influencia de varios medios de cultivo sobre la infección celular

Empleando en el cultivo de las células los medios experimentales anteriormente descritos y que son: medio de mantenimiento, A, B, C, D, E, F, VI y VII, se inoculan como se ha hecho en el experimento precedente, 1.000 DLR_{50} del virus en experimentación a frascos de cada tipo de células, se le añade el medio que se va a experimentar y se colocan a 37 °C. Testigos de todos los medios con cultivos de células sanas de las dos clases, se colocan en las mismas condiciones que las inoculadas. La observación, toma de muestras e inoculación en ratones de las mismas, se hace exactamente igual que en el experimento precedente. Todos los medios utilizados tienen un pH de 7,2.

Influencia de la adsorción del virus a varios pH sobre la infección celular

Se inoculan frascos de células de cada una de las dos cepas con el virus en experimentación, manteniéndose la suspensión de virus en solución de Hanks a pH 6, 7 y 8 durante el tiempo de adsorción, que en este caso son cuatro horas a 37 °C; habiéndose llegado a esta conclusión sobre el tiempo de adsorción por medio de experimentos realizados con distintos tiempos y que dieron como resultado que el de cuatro horas es el óptimo en este caso.

Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el sobrante de virus inoculado y no adsorbido lavando dos veces los cultivos celulares con solución de Hanks, se añade luego medio de mantenimiento y se colocan los frascos a 37 °C.

Se observan los cultivos diariamente tomándose muestras del medio e inoculándose éstas en ratones para su titulación, como en todos los restantes experimentos.

Determinación de la proporción de virus liberado al medio

Como en general los títulos de virus liberado son bajos, como puede observarse a la vista de los cuadros, no hemos realizado verdaderas titulaciones según el método de Reed y Muench (12) en cada toma, sino que nos orientamos por el número medio de ratones muertos en cada experimento. Naturalmente, resultan menos exactos los resultados, pero

sirven de orientación para observar la evolución de la infección a lo largo del experimento hasta llegar a los resultados finales más interesantes. Ya que consideramos como más significativa la comparación entre los resultados negativos y positivos que las variaciones intermedias.

RESULTADOS

Termorresistencia

Según los datos consignados en el *cuadro 1*, observamos que en el virus de la encefalitis de San Luis y a las temperaturas de 39, 37, 35 y 28 °C, la cantidad de virus a las veinticuatro horas, desciende de 1.000 DLR_{50}/0,03 ml a DLR_{50}/0,03 ml o menos.

Cuadro 1. Control de termorresistencia de ESL

Grados centígrados	De 4 ratones inoculados	
	Muertos a las 24 horas	Muertos a las 48 horas
39	1	0
37	2	0
35	1	0
28	2	0
20	4	4

A 20 °C y en el mismo período de tiempo, encontramos que se conserva la cantidad suficiente para causar la muerte de todos los ratones inoculados.

En las muestras recogidas a las cuarenta y ocho horas se observa que la cantidad que queda del virus a las temperaturas de 39, 37, 35 y 28 °C, no es detectable por inoculación en ratón; y sólo existe virus en la muestra de 20 °C.

Influencia de varias temperaturas sobre la infección celular

Los datos del *cuadro 2* pertenecen al experimento efectuado con el virus de la encefalitis de San Luis en células HeLa, haciéndose una

Cuadro 2. Influencia de diferentes temperaturas sobre la infección de células HeLa con ESL

Grados centígrados	Virus	2 días		4 días		5 días		6 días		7 días		9 días		10 días		11 días		15 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
39	ESL	0	+ + +	3	+ + + +														
	Testigo		+		+ +														
37	ESL	1	0	2	0		+ +	4	+ + +	4	+ + +								
	Testigo		0		0		0		0		0								
35	ESL	0	+	3	+ + +	3	+ + +												
	Testigo		0		0		0												
28	ESL	1	0	1	0		0	1	0		0	4	0	4	+	0	+	3	+ +
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0
20	ESL	1	0	0	0		0	0	0		0		0		0		0	0	+
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0

Se inoculan cuatro ratones con cada muestra de medio.

R_m = ratones muertos. A_c = aspecto de las células. 0 a + + + = proporción de células con efectos citopáticos, en el cultivo.

+ + + + = destrucción completa del cultivo.

comparación del comportamiento y aspecto de los cultivos de células HeLa infectadas y los cultivos sanos de las mismas células que hemos puesto como testigos a cada una de las temperaturas. A continuación resumimos los resultados obtenido.

A la temperatura de 39 °C, la evolución de la infección resulta acelerada, ya que las células presentan alteraciones y empieza a degenerar el cultivo a los dos días después de la inoculación, pero todavía no se encuentra virus libre en el medio de cultivo; a los cuatro días, el cultivo presenta una destrucción total y en la muestra de medio ensayada se pone de manifiesto, por inoculación en ratón, una pequeña cantidad de virus.

A 37 °C, empieza a detectarse virus el segundo día después de la inoculación, aunque el cultivo celular no presenta todavía efectos citopáticos hasta el quinto día; y a partir del sexto, estos efectos se hacen más visibles, hasta la destrucción del cultivo a los siete días; en estos dos últimos, las muestras de medio contienen cantidades importantes de virus.

A 35 °C, parece estar un poco acelerada la evolución de la infección, pero las cantidades de virus liberado no son elevadas.

A 28 °C, vemos que hay un retraso considerable en la evolución de la infección, ya que los efectos citopáticos no empiezan a aparecer hasta el décimo día, y entonces lo hacen en muy pequeña proporción; encontrándose, sin embargo, escasas cantidades de virus a partir del segundo día de la inoculación. En las muestras de los días noveno y décimo es donde se obtiene la mayor cantidad de virus, disminuyendo luego.

A 20 °C, no se observan a lo largo de los quince días que dura el cultivo celular, ni aparición de virus, ni efecto citopático alguno.

Observamos que durante todo el experimento, los testigos, exceptuando el de 39 °C, se conservan sin alteración a todas las temperaturas estudiadas, y también que la tendencia a metabolizar el medio es mucho menos en las células infectadas que en los testigos sanos.

En el *cuadro* 3 están reunidos los datos del estudio de la evolución de la infección celular a las mismas temperaturas anteriores, pero inoculando virus de la encefalitis de San Luis en cultivos de amnios humano, y la comparación del comportamiento y aspecto de los cultivos de células de amnios humano infectadas, con sus testigos respectivos. Observamos que, en general, la duración de la evolución de los cultivos se prolonga con respecto a los de HeLa.

Cuadro 3. Influencia de diferentes temperatur

Grados centígrados	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		6 días		7 días	
		Rm	Ae	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	
39	ESL	0		0	0		0	1	0	0	+	0	+
	Testigo	0			0		0		0		0		(
37	ESL	+		1	+		+		+	0	+	1	+
	Testigo	0			0		0		0		0		(
35	ESL	0		0	0		0	1	0	0	+	0	+
	Testigo	0			0		0		0		0		(
28	ESL	0		0	0		+		+		+	0	+
	Testigo	0			0		0		0		0		+
20	ESL	0		0	+		+ + +		+ + +		+ + +	0	+ +
	Testigo	0			0		+ + +		+ + +		+ + +		+ +

bre la infección de células AH con ESL

8 días		9 días		10 días		11 días		13 días		14 días		15 días	
m	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac
	++		++		+++	4	++++						
	++		++		++		+++						
	+		+	3	++	4	++	2	++		++	4	++++
	0		0		0		0		0		0		0
	++		++	0	++++								
	0		+		+								
	++		++		++		++	0	++		++	1	++
	+		+		+		+		+		+		+

A 39 °C empiezan a presentarse los efectos citopáticos al sexto día y van avanzando progresivamente hasta la destrucción total del cultivo, que se produce a los once días; solamente en la última muestra de medio, tomada a los once días, encontramos cantidad importante de virus.

A 37 °C y a partir del primer día de la inoculación, encontramos efectos citopáticos que progresan muy lentamente. La mayor cantidad de virus liberado al medio se encuentra a partir de los ocho días hasta la destrucción de las células, a los quince días.

A 35 °C no aparece virus detectable a todo lo largo de la evolución del cultivo, y las células empiezan a degenerar a partir del sexto día.

A 28 °C observamos que a los tres días de la inoculación aparecen efectos citopáticos en las células, estabilizándose hasta que se da por terminada la experiencia, no liberándose virus prácticamente.

A 20 °C se destruye rápidamente todo el epitelio celular y en las muestras inoculadas no aparece virus.

Observamos que 37 y 35 °C son las temperaturas en donde existe diferencia entre la evolución de las células infectadas y los testigos, ya que éstos continúan normales, mientras que en los cultivos infectados se produce la destrucción total.

A 39 y 20 °C va casi paralela la degeneración de las células infectadas y de los testigos.

Influencia de varios medios de cultivo sobre la infección celular

Observamos en el *cuadro 4*, que resume los datos obtenidos sobre la influencia de distintos medios de cultivo sobre células HeLa infectadas con virus de encefalitis de San Luis, los siguientes resultados.

Con los medios C, D, E y F se produce una rápida degeneración del cultivo y prácticamente no encontramos que haya liberación de virus.

El medio A acorta el período de evolución de la infección, con poca producción de virus; el de mantenimiento da lugar a abundante producción de virus y con el medio B disminuye la cantidad de virus liberado, siendo para los dos últimos normal el período de evolución del cultivo.

El medio VI induce a resultados semejantes a los anteriores, y finalmente el medio VII resulta óptimo en este caso, ya que además de tener

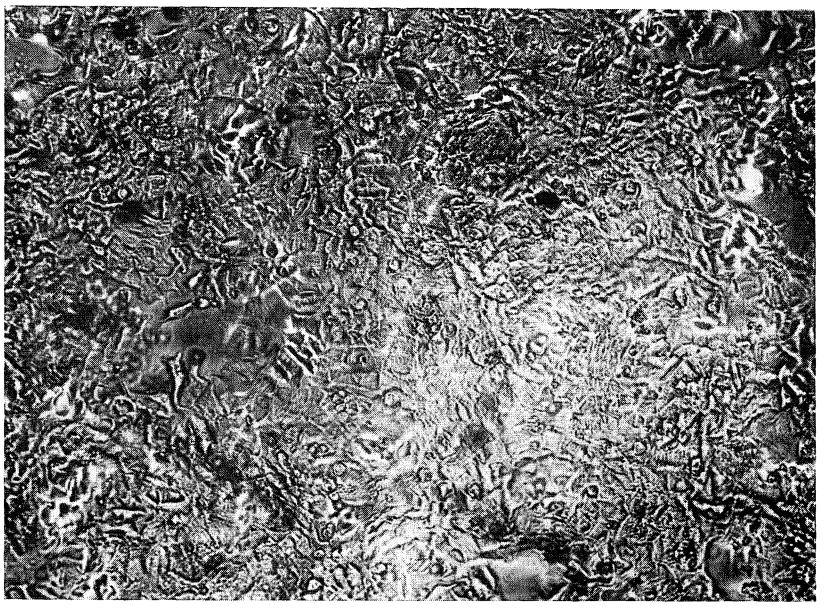


Figura 1. Células HeLa normales

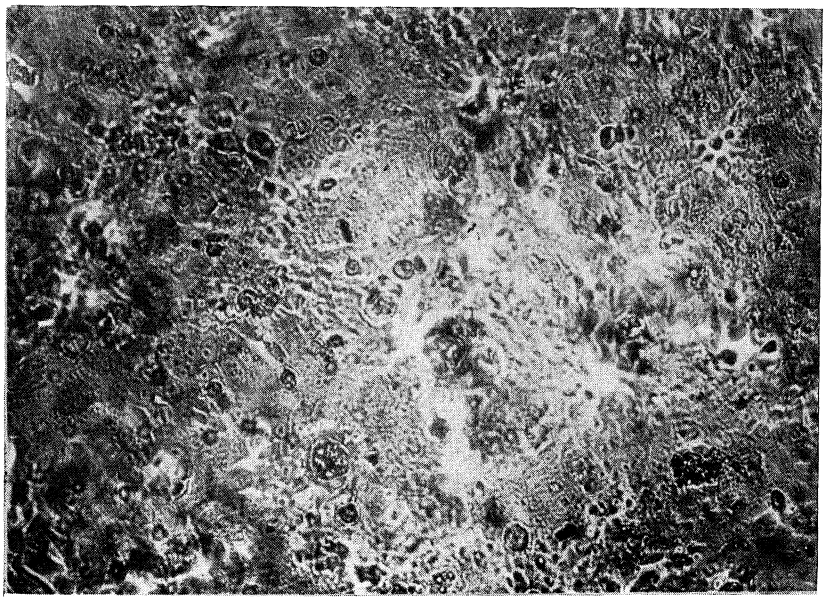


Figura 2. Células AH normales

Figura 3. Células HeLa infectadas con ESL. Pase 3.º

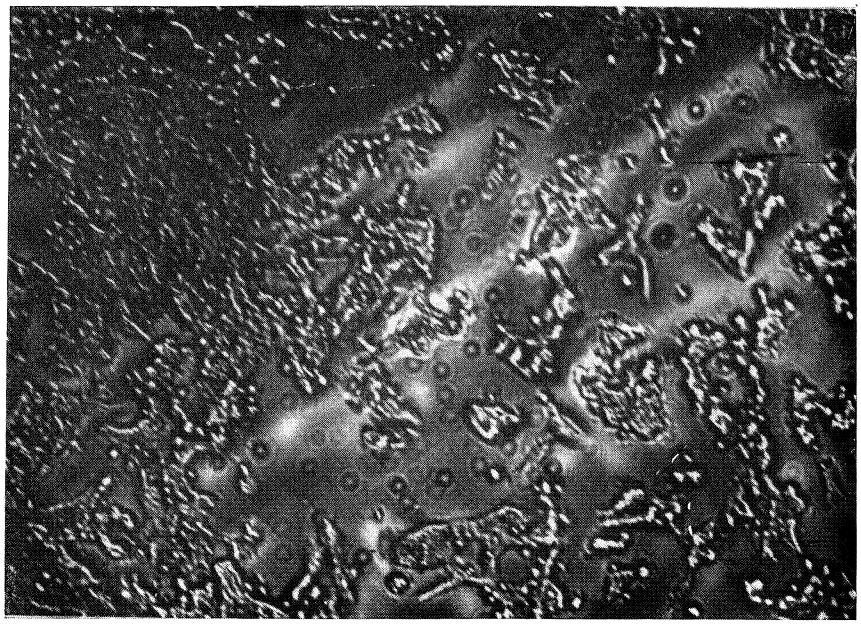


Figura 4. Células AH infectadas con ESL. Pase 4.º

una larga duración el cultivo, la liberación de virus al medio se produce desde el segundo día y en cantidades más elevadas.

De la comparación entre el aspecto que presentan los cultivos de células HeLa infectadas y los testigos de células sanas sometidas a las mismas condiciones, obtenemos los siguientes datos también consignados en el *cuadro 4.*

Con los medios A, C, D, E y F, la degeneración de los cultivos infectados transcurre paralela a la de los testigos; en cambio, con los medios de mantenimiento, B, VI y VII existe una gran diferencia entre los testigos, que permanecen sin alteración, y las células infectadas, que degeneran, coincidiendo esta degeneración con la aparición de virus libre en el medio.

Los resultados obtenidos al ensayar los distintos medios de cultivo con las células de amnios humano infectadas con encefalitis de San Luis y su comparación con los testigos de células sanas durante su mantenimiento con distintos medios, se resumen en el *cuadro 5,* describiéndose a continuación.

Al emplear el medio de mantenimiento y el medio E, la duración del cultivo es semejante con ambos medios, la liberación de virus es algo menor con el medio E y existe diferencia en la aparición de los efectos citopáticos en las células, ya que con el medio de mantenimiento se presentan a los cinco días y van progresando hasta la destrucción del cultivo, y con el medio E aparecen a los seis días de la inoculación en pequeñas cantidades y luego repentinamente sobreviene la destrucción de las células, con abundante liberación de virus.

En cuanto a los medios A y F resulta semejante su influencia, induciendo a una rápida destrucción del cultivo celular; en cambio, con el medio A se libera algo de virus, cosa que no sucede con el F.

Con el medio de cultivo B se obtiene una producción considerable de virus desde el segundo día después de la inoculación, sin efectos citopáticos, aunque al sexto día se destruye el epitelio celular.

Al utilizar el medio C, encontramos un marcado retraso en la aparición de los síntomas de la infección, ya que hasta el noveno día no se han encontrado efectos citopáticos, apareciendo este día y continuando hasta el duodécimo, en que se produce la degeneración total de las células. En cambio, el máximo de virus liberado al medio, aparece en los días séptimo y noveno, cuando prácticamente el aspecto del cultivo es normal.

Cuadro 4. Influencia de diferentes medios de

Medios	Virus	2 días		3 días		4 días		5 días	
		Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	A
Mantenimiento	ESL		0	0	++		++	2	++
	Testigo		0		0		0		0
A	ESL		+		+	0	++	3	++
	Testigo		0		+		+		++
B	ESL		0	0	0		0	3	+
	Testigo		0		0		0		0
C	ESL		++		++	0	+++		++
	Testigo		0		0		+++		++
D	ESL		+		+	0	+++	1	++
	Testigo		+		+++		+++		++
E	ESL		+		++		++	0	++
	Testigo		0		0		0		++
F	ESL		+	0	++		+++	1	++
	Testigo		0		+++		+++		++
VI	ESL		+		+	1	+	3	++
	Testigo		0		0		0		0
VII	ESL	4	0	4	+		+	4	+
	Testigo		0		0		0		0

vo sobre la infección de células HeLa con ESL

6 días		7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días	
R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
4	+++	4	+++										
	0		0										
	+	3	++	4	+++								
	+		+		+								
3	++++												
0	+++	0	++++										
	+++		++++										
3	+++		+++	4	+++								
	0		0		++								
	++	3	++		++	4	+++	4	+++	3	+++	3	++++
	0		0		0		0		0		0		0

Con el medio D, y a partir del tercer día, se observa una aparición progresiva de los síntomas de la infección, pero no encontramos virus detectable a lo largo del experimento.

Usando el medio VI, en la primera parte del período de la evolución de la infección celular (días cuarto y quinto), encontramos virus en el medio en cantidad importante, no presentándose todavía efectos citopáticos; del día séptimo al undécimo la evolución del cultivo tiene lugar muy lentamente, acompañada de liberación de virus al medio de cultivo, pero en cantidades menores que al principio.

Con el medio VII se consigue que las células se conserven durante largo tiempo. Desde el segundo día hasta el noveno no aparece ninguna alteración en las células, obteniéndose en cambio cantidades de virus relativamente elevadas. A partir del décimo día, prácticamente no se encuentra virus, y desde los catorce días después de la inoculación empiezan ya a aparecer los efectos citopáticos de forma progresiva, hasta que a los veinte días ya no existe epitelio celular.

Con los medios de mantenimiento B, C, VI y VII existe gran diferencia entre los testigos, que no presentan alteraciones, y las células infectadas, que manifiestan efectos citopáticos en proporción considerable.

Con los medios A, D y F existe un paralelismo estrecho en la aparición de los efectos citopáticos y la evolución de los cultivos entre las células infectadas y los testigos.

Finalmente, para el medio E, aunque en el testigo aparecen algunos síntomas de degeneración, hay mucha diferencia en cuanto a la intensidad de los mismos en comparación con los que presentan los cultivos infectados.

Influencia de varios pH sobre la infección celular

Unicamente empleamos los pH 6, 7 y 8, porque el normal desarrollo de las células no tiene lugar fuera de estos límites y podríamos obtener unos datos erróneos, ya que la degeneración de los cultivos sobrevendría exclusivamente por la acción del pH.

El *cuadro* 6 se refiere a la evolución de la infección de la encefalitis de San Luis en células HeLa sometidas a diferentes pH durante el tiempo de adsorción del virus, y la comparación con los testigos de células sanas en las mismas condiciones. A continuación se resumen dichos resultados.

A pH 6 y pH 7 se obtienen resultados semejantes en cuanto al aspecto

Cuadro 5. Influencia de diferentes medios de cultivo sobre la infección de células AH con ESL

Medios	Virus	2 días		3 días		4 días		5 días		6 días		7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días		13 días		14 días		15 días		16 días		17 días		18 días		19 días		20 días		21 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
Mantenimiento	ESL		0	1	0		0		++	4	+++		+++	4	++++																								
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0																			
A	ESL		+		++	3	++++																																
	Testigo		+		++		++++																																
B	ESL	2	0	2	0		+	2	+	3	++++																												
	Testigo		0		0		0		0		0																												
C	ESL		0		0	3	0		0		0	4	0		0	4	+		++		++	1	++++																
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0																		
D	ESL	0	0	0	+	0	+	0	+	0	++	0	+++																										
	Testigo		+		+++		++++																																
E	ESL		0		0	3	0		0		+	4	+	4	++++																								
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		+		+		+		+																
F	ESL	0	++	0	++	0	++++																																
	Testigo		+		++		++		++++																																
VI	ESL		0	1	0	4	0	4	0		0	0	+		+	3	+		++	2	++++																		
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		++		++		++		++												
VII	ESL	4	0		0	4	0	4	0	4	0	2	0	2	0	3	0	0	0		0		0		0	2	+		++		++	1	++		++		+++	2	++++	
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0	

Cuadro 6. Influencia de diferentes pH durante la adsorción del virus ESL por células HeLa

pH	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		6 días		7 días		8 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
6	ESL	+	0	+	+++	3	+++	3	+++						
	Testigo	0		0	0		0		0		+		+		
7	ESL	+	0	+	+++	4	+++	4	+++						
	Testigo	0		0	0		0		0		0		0		
8	ESL	0	0	+	++	2	+++	3	+++		+++	4	+++		
	Testigo	0		0	+		++		++		++		++		

Cuadro 7. Influencia de diferentes pH durante e

pH	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		5 días		6 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A
6	ESL		0	0	0		0		0	2	0		0
	Testigo		0		0		0		0		0		0
7	ESL		0	0	0		0		0	0	0		0
	Testigo		0		0		0		0		0		0
8	ESL		0	1	0		0		0	0	0		0
	Testigo		0		0		0		0		0		0

empo de adsorción del virus ESL por células AH

7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días		13 días	
R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
0	0		+				+	3	+++		+++	3	+++
	0		0		0		0		0		0		
0	+		+				++	3	+++				
	0		0		0		0		0		0		0
	0	0	0		0		+	2	+++		+++	3	+++
	0		0		+		+		+		+		+

de las células y a la duración de la evolución de la infección; desde el primer día empiezan a presentarse efectos citopáticos que van aumentando hasta llegar a la degeneración casi total del cultivo al sexto día. El virus liberado en el medio se encuentra en mayor cantidad en el experimento realizado a pH 7 que a pH 6. Sin embargo, resulta que a los pH 6 y 7 existe una gran diferencia entre el aspecto que presentan las células infectadas, con efectos citopáticos desde el primer día después de la inoculación, y los testigos de células HeLa sin infectar, que prácticamente no sufren alteraciones.

En cuanto al pH 8 resulta un poco más larga la duración del cultivo, pero no existe gran diferencia con los dos anteriores respecto a la liberación de virus. A este pH 8, las células del testigo presentan efectos citopáticos inespecíficos, aunque no tan pronunciados como los infectados, debido a que este pH durante la adsorción no les resulta favorable.

En las células de amnios humano infectadas con encefalitis de San Luis y sometidas a los mismos pH anteriores durante el tiempo de adsorción, se observa *(cuadro 7)* que hay un pequeño retraso en la evolución de la infección en cuanto a la aparición de los efectos citopáticos para los tres pH, con respecto al experimento realizado con células HeLa, siendo menor en el pH 7 y aumentando progresivamente para los de 6 y 8.

Las cantidades de virus liberadas son semejantes a pH 6 y pH 8 y un poco menores a pH 7, pudiendo ser debido a que la destrucción del epitelio celular tiene lugar más rápidamente. En cuanto a la acción de estos pH sobre los testigos no infectados, los resultados indican *(cuadro 7)* que los testigos de los pH 6 y 7 evolucionan con absoluta normalidad; sin embargo, a pH 8 se presentan síntomas de degeneración.

DISCUSION

A la vista de los resultados obtenidos mediante el estudio de la termorresistencia del virus, objeto de este trabajo, deducimos que su sensibilidad a la mayoría de las temperaturas estudiadas (39, 37, 35 y 28 °C) es elevada.

Debe tenerse en cuenta que la naturaleza del medio en que se encuentra en suspensión el virus y su pH tienen gran influencia sobre la resistencia a la temperatura y por ello nosotros hemos empleado como dilu-

yente el medio de mantenimiento que estimamos más favorable para la conservación del virus.

La temperatura de 20 °C es la mejor tolerada por el virus,, dato que puede ser interesante, ya que cepas de virus que se multipliquen fácilmente cuando se cultivan a esta temperatura, darán un rendimiento más elevado en virus al sumarse a la menor inactivación gradual del virus liberado producida por la temperatura de cultivo, la producción normal de partículas víricas.

Es indudable que la temperatura de incubación de los cultivos celulares ejerce una acción importante sobre el complejo virus + célula. Lwoff (8) indica que la capacidad reproductiva del virus poliomielítico depende de la temperatura de incubación durante el ciclo de multiplicación; otros autores, asimismo, han comprobado la influencia de diversas temperaturas sobre virus cultivados en células.

Carp y Koprowski (2), estudiando virus poliomielíticos, encuentran cepas que se multiplican lo mismo a la temperatura de 40 °C que a la de 37 °C, y otras cuyo grado de multiplicación es inferior a 40 °C que a 37 °C.

Carp y colaboradores (2) observan que cultivando una cepa de poliomielitis 2 a 23 °C en células de riñón de mono, aquélla se hace más estable, reduciéndose su patogenicidad. También Carp y colaboradores (4), en otro trabajo, cultivando una cepa de poliomielitis tipo 3, en células de riñón de mono, a 23 °C, durante los dos primeros pases no observan efectos citopáticos hasta los diez días de cultivo, pero en el tercer pase aparecen a los tres días. Continuando este experimento y relacionando todos los resultados por ellos obtenidos, concluyen que existen determinadas cepas de virus poliomielítico, que cultivadas a 23 °C disminuyen en su neuropatogenicidad; que la capacidad reproductiva puede sufrir marcadas alteraciones por la influencia de diversas temperaturas de cultivo, y que una causa del diverso comportamiento de un mismo virus frente a temperaturas diferentes puede ser debida a la existencia de partículas víricas que posean temperaturas óptimas de multiplicación distintas.

Nosotros, al determinar las temperaturas más favorables para la multiplicación del virus en estudio, observamos, en primer lugar, que para el virus de la encefalitis de San Luis en células HeLa, la mayor producción de virus se consigue a la temperatura de 37 °C, siendo menos favorables las otras ensayadas y completamente desfavorable la

de 20 °C; al ser cultivado sobre células de amnios humano, la temperatura de 37 °C es la más favorable, siendo seguida por la de 39 °C, y son inadecuadas las restantes.

En todos los experimentos realizados, las células HeLa infectadas cultivadas a 39 °C experimentan una rápida alteración que también se manifiesta en los testigos de células sin infectar, debido a que resulta excesiva temperatura para la vida de las células en este caso. Las restantes temperaturas ensayadas no parecen ejercer efectos nocivos sobre las células normales; por lo tanto, debemos atribuir los efectos citopáticos y las diferencias en su período de aparición a las temperaturas utilizadas.

De todas formas, a 39 °C y a pesar de que dicha temperatura altera rápidamente las células HeLa, existe multiplicación de virus, ya que éste se recupera del cultivo después de transcurrir períodos de tiempo más que suficientes para la desaparición del virus inoculado (tiempo de inactivación a 39 °C, menos de veinticuatro horas), siendo dichos períodos de cuatro días para encefalitis de San Luis en HeLa, y de once en amnios humano. Las células de amnios humano resisten bien la incubación a la temperatura de 39 °C.

A 35 °C, las células HeLa infectadas con el virus presentan una evolución algo más rápida que a 37 °C, mientras que en las células de amnios humano infectadas a 28 °C, la evolución es lenta, con pocos efectos citopáticos, estando éstos ausentes por completo a 20 °C.

Por otra parte, observando los testigos podemos deducir que las células HeLa se mantienen en condiciones vitales a temperaturas que oscilan de 37-20 °C.

Relacionando efectos citopáticos y producción de virus, observamos que una evolución forzada del cultivo, como sucede a 39 °C, no provoca una mayor producción de virus, sino que la síntesis de éste en cantidad considerable necesita un período de tiempo mínimo, que naturalmente será específico para cada virus y cada especie celular. Por otra parte, una evolución lenta del cultivo con aparición retardada de efectos citopáticos significativos provocada por temperaturas relativamente bajas, cuando éstas no lo son excesivamente(28 °C) da lugar a niveles aceptables de virus, que aparecen también tarde. No obstante, también existe liberación de virus por las células al medio en pequeña cantidad, cuando aún no han aparecido efectos citopáticos sensibles.

En los experimentos realizados en células de amnios humano, se reve-

lan ciertas diferencias en su comportamiento general comparado con las células HeLa. Estas células de amnios humano son más sensibles a temperaturas bajas que las células HeLa y algo menos sensibles a las altas. En posible relación con esto, se observa un retraso en la aparición de efectos citopáticos y de la multiplicación de virus a las temperaturas de 39, 37 y 35 °C con respecto a las células HeLa infectadas; sin embargo, a las temperaturas más bajas, los efectos citopáticos aparecen antes que en células HeLa, pero comparando con los testigos sin infectar y asociando el dato de que no se obtiene virus detectable, nos hace pensar que estos efectos citopáticos son inespecíficos, debidos a la temperatura de incubación principalmente.

Como en el caso de las células HeLa, observamos un acortamiento del período evolutivo de la infección a 39 y 35 °C con respecto a 37 °C, aunque, por otra parte, los rendimientos de virus elevados sólo se encuentran a 37 y 39 °C, mientras que a 28 y 20 °C no se encuentra prácticamente virus, en contraposición con las células HeLa que producen virus a 28 °C.

Es ya conocido que los cambios de composición en el medio de mantenimiento hacen variar la sensibilidad celular frente a los virus, dentro de ciertos límites.

Rappaport y Melnick (11) establecen una relación entre efectos citopáticos y grado de multiplicación del virus cuando el medio de mantenimiento es rico en componentes nutritivos y también que la adición de extracto de levadura aumenta la multiplicación. Sin embargo, en estudios realizados por estos autores en células de amnios humano, estos fenómenos son más complejos e indican que las diferencias entre estas y otras células pueden ser debidas a marcadores tisulares específicos de dichas células, y concluyen que los efectos citopáticos dependen en gran parte de las características del medio de cultivo.

Considerando fundamental para nuestro trabajo el estudio de diferentes medios, atendiendo principalmente a determinar la importancia de determinados componentes para el metabolismo normal de la célula y la síntesis del virus, hemos utilizado nueve medios con una composición básica igual, sustituyendo algún componente o eliminándolo. Así los resultados serán más comparables y podremos establecer la indispensabilidad de algunas sustancias.

Con los medios C, D, E y F, que son los que carecen de suero, las

células no producen prácticamente virus, resultado concordante con el obtenido por Andjaparizde y colaboradores (1), que demuestran la necesidad de suero para la multiplicación del virus de la encefalitis centroeuropea transmitida por garrapatas.

Además de la estricta necesidad de suero para la síntesis de virus, las células también necesitan los factores contenidos en aquél, ya que sin él rápidamente entran en destrucción, quedando en pie el problema de si la causa de la no producción de virus es la falta de factores para la síntesis de éste por la célula, o la rápida degeneración celular; aunque la primera hipótesis parezca más importante, la duración del cultivo en algún caso sería suficiente para la obtención de cierta cantidad de virus. La albúmina bovina que posee el medio F no es capaz de sustituir al suero.

Con el medio A, que posee gran cantidad de suero, aunque carece de glucosa, se obtiene virus en cierta cantidad, a pesar de que la evolución de las células, como nos indica el testigo no infectado, está también dirigida a la pronta degeneración celular.

La glucosa no es indispensable para la síntesis vírica, pero sí lo es para el metabolismo normal de las células.

El medio llamado de mantenimiento, que posee una cantidad moderada de suero (3 por ciento) y todos los componentes normales, da lugar a una producción abundante de virus y una evolución normal de las células con aparición de los efectos citopáticos específicos, ya que éstos no aparecen en los testigos sin infectar. Sin embargo, el medio B, que posee una cantidad elevada de suero (15 por ciento), no por ello eleva el rendimiento de virus, sino que quizá lo disminuye, afectando algo a las células, como se ve en los testigos sin infectar; prueba de que el exceso de suero no es favorable.

El medio VI posee suero en relativamente poca cantidad (1 por ciento) y además albúmina bovina. Esta asociación es bastante favorable para el virus de la encefalitis de San Luis. Asimismo, el medio VII, que posee bastante cantidad de suero (10 por ciento) y extracto de levadura, es muy favorable para el virus de la encefalitis de San Luis, lo cual indica que la asociación del suero con otras substancias que contienen principalmente factores importantes para el metabolismo celular, como son la albúmina bovina y el extracto de levadura, da lugar a un perfecto estado de mantenimiento de las células normales, como indican los

testigos, y unas condiciones favorables para la síntesis del virus. Los efectos citopáticos aparecen relativamente pronto.

El comportamiento de las células de amnios humano difiere bastante en este aspecto de las células HeLa. En los resultados obtenidos con el virus de la encefalitis de San Luis, encontramos con respecto a los medios sin suero (C, D, E y F), que con el primero y el tercero (C, E) se produce virus, y con el segundo y cuarto (D, E), no; los efectos producidos por estos medios en los testigos son inespecíficos y muy letales. Esto explicaría que los medios sin suero como son C y E, den lugar a la producción de virus, probablemente porque al conservarse las células en buen estado éstas son capaces de sintetizar virus en cantidades apreciables.

Quizá las células de amnios humano de origen no maligno sean capaces de sintetizar cantidades apreciables de virus sin el concurso del suero, debido a que su sistema enzimático sea más completo que el de las células HeLa de origen canceroso.

El medio A, sin glucosa, pero con exceso de suero (15 por ciento), provoca rápida degeneración celular, como ocurre con las células HeLa, y la cantidad de virus liberado es más bien escasa, por lo que deducimos que también para las células de amnios humano es necesaria la glucosa para el metabolismo normal, pero no para la síntesis del virus.

El medio de mantenimiento y el B mantienen las células en buen estado, los efectos citopáticos específicos aparecen y evolucionan normalmente y la producción de virus es inferior para el medio B como sucede en las células HeLa, por lo que le damos la misma explicación.

Los medios VI y VII son favorables para el mantenimiento de las células, principalmente el VII, que contiene extracto de levadura; los efectos citopáticos específicos del virus, al contrario que sucede con las células HeLa, tardan mucho en aparecer y son de evolución lenta, aunque la liberación de virus comienza en cantidades considerables aún antes de aparecer aquéllos. Estos medios confieren buena vitalidad a las células, que aunque infectadas consiguen sobrevivir largo tiempo.

La adsorción del virus por las células es el primer fenómeno que se produce al ser éstas infectadas. De los estudios realizados, la mayor parte indican que dichos fenómenos serían de carácter electrostático por la aparición en la superficie celular de cargas positivas a causa de la modificación inducida por el virus, y que actuarían sobre la carga negativa del

virus. Otros indican la posible existencia de un sistema enzimático. De todas formas, el pH de la suspensión de virus debe influir considerablemente en este primer paso de la infección celular, que determinará el resultado de los siguientes, que son la penetración en la célula, multiplicación del virus en ella y finalmente liberación del virus.

La adsorción del virus por la célula necesita un período de tiempo determinado para cada virus y especie celular; por lo general, relativamente corto, no superior a algunas horas.

Si nosotros mantenemos el virus en contacto directo con las células en una suspensión a un pH determinado (6, 7 y 8, en este trabajo), durante un período de tiempo determinado como suficiente en condiciones normales para que se realice el fenómeno, eliminando después la suspensión, los resultados, controlados después por el estudio de los efectos citopáticos y liberación de virus, nos darán una idea de la influencia de los pH ensayados.

Del estudio de los datos obtenidos con estos experimentos deducimos que el período de cuatro horas durante el que están sometidas las células a estos pH, tiene cierta influencia en su evolución posterior, ya que los testigos sin infectar sometidos a las mismas condiciones—en el caso de las células HeLa, a pH 7—permanecen normales largo tiempo, mientras que a pH 6 empiezan a degenerar a los siete días, y a pH 8, antes, a los tres días, aunque permanece después estacionario el cultivo.

Las células de amnios humano, más resistentes, se mantienen bien, después del tratamiento a pH 6 y 7, degenerando a pH 8, pero más tarde que las HeLa.

Los efectos citopáticos aparecen antes en las células HeLa infectadas con el virus de la encefalitis de San Luis, debido a su mayor sensibilidad, resultando para las células HeLa igual la evolución del cultivo inoculado a pH 6 y 7 y más largo a pH 8; en amnios humano sucede prácticamente igual, con más retraso en general para todos los pH. Siendo el rendimiento en virus semejante, estimamos como pH favorables el 6 y 7, y algo desfavorable el 8, ya que su retraso debe ser originado por una menor cantidad de virus adsorbido.

RESUMEN

El virus antes citado es muy sensible a las temperaturas de 39, 37, 35 y 28 °C; la temperatura mejor tolerada por el virus es la de 20 °C.

Ensayando las cinco temperaturas indicadas sobre la evolución de la infección en cultivos de células de amnios humano y HeLa infectados con dicho virus, se observa que las temperaturas más favorables son, para el virus de la encefalitis de San Luis cultivado en HeLa, 37 °C, y en amnios humano, 37 y 39 °C. Resulta completamente desfavorable la temperatura de 20 °C, al menos durante el primer pase.

La temperatura de 39 °C ejerce cierta acción nociva sobre las células, mientras que las restantes no las alteran. Por otra parte, las células de amnios humano son más resistentes que las HeLa a las temperaturas altas y más sensibles a las bajas.

Ensayando nueve medios de cultivo diferentes sobre ambos tipos de células infectadas con el virus de la encefalitis de San Luis, deducimos en el caso de las células HeLa que con los medios carentes de suero (C, D, E y F), la síntesis de virus no se verifica; como asimismo que las células sin infectar necesitan este elemento para conservar su vitalidad normal.

La glucosa es necesaria para la vitalidad celular, pero su falta no excluye la multiplicación del virus.

El exceso de suero no eleva la multiplicación del virus y en cambio ejerce en los medios de mantenimiento un efecto desfavorable, acelerar la degeneración del cultivo; sin embargo, una cantidad moderada de suero en el medio de mantenimiento da lugar a un estado normal de las células y a una producción también normal de virus.

Las asociaciones de suero y albúmina bovina y de suero y extracto de levadura son muy favorables para mantener las células en buenas condiciones de vitalidad y para que la multiplicación del virus sea considerable. La segunda asociación es la más favorable para el de la encefalitis de San Luis, cultivados ambos en células HeLa.

En las células de amnios humano infectadas con virus de la encefalitis de San Luis y mantenidas con los medios ya citados, los resultados difieren en algunos casos. Los medios sin suero D y F alteran la vitalidad normal de las células y evitan la multiplicación del virus; otros dos medios restantes sin suero, C y E, mantienen mejor las células en buen

estado y dan lugar a una escasa multiplicación del virus, debido quizá a una mayor adaptación de esta cepa de células a condiciones adversas de medio.

Los medios sin glucosa y con exceso de suero producen efectos semejantes a los citados para las células HeLa, como asimismo el de mantenimiento.

Los medios VI y VII con asociación de suero + albúmina bovina y suero + extracto de levadura son favorables, como sucede en células HeLa, y la evolución de la infección es mucho más lenta en amnios humano.

Para determinar la influencia del pH en la adsorción del virus sobre las células, ensayamos los pH 6, 7 y 8, obteniendo como más favorables los pH 6 y 7 para el virus de la encefalitis de San Luis en ambos tipos de células.

Las células HeLa sometidas durante el período de adsorción del virus a dichos pH, soportan bien el pH 7, viéndose algo afectadas en los otros dos pH; las células de amnios humano son más resistentes, siendo sólo ligeramente afectadas por el pH 8.

Esquemáticamente diremos que cultivado el virus en células HeLa, son más favorables para el mismo: la temperatura de 37 °C, el medio de asociación de suero + extracto de levadura (medio VII), y el pH 7, durante el período de adsorción del virus.

Cultivado el virus en células de amnios humano, resultan favorables: la temperatura de 37 ó 39 °C, el medio VII y los pH 6 y 7 durante el período de adsorción del virus.

Agradecemos a la señorita María del Carmen Granados su valiosa ayuda técnica en la realización de este trabajo.

SUMMARY

St. Louis encephalitis virus, cultivated in mouse's brain, adapt itself to HeLa cells, with a fixed two-day period for evolution of the infection; in Human Amnion cells this period is of four days which indicates a greater resistence of these cells.

By testing five temperatures upon the evolution of the infection in cultures of Human Amnion and HeLa cells infected with SLE virus

we observe that the most favourable temperatures are: 37 °C cultivated in HeLa, and 37 °C and 39 °C in Human Amnion. Temperature of 20 °C is entirely unfavourable, at least during the first passage.

Temperature of 39 °C has a certain nocious action upon cells, whereas the remaining temperatures do not alter them. Moreover, Human Amnion cells are more resistent to high temperatures, and less resistent to low ones, than HeLa cells.

By trying nine different culture media upon both types of cells infected with St. Louis encephalitis virus, we deduce that HeLa cells do not synthetize virus with media without serum also, that uninfected cells need this element to retain their normal vitality.

The association of serum and bovine albumin as well as that of serum and yeast extract, are very favourable to maintain the cells in good conditions of vitality and to a considerable proliferation of the virus. The latter association is the most favourable for St. Louis encephalitis virus cultivated in HeLa cells, and the association of serum an bovine albumin is favourable for the evolution of the infection in Human Amnion cells.

HeLa cells, subjected to pH 6, 7 and 8 during the period of virus adsorption, tolerate well pH 7, whereas they are somewhat affected by the other pH. Human Amnion cells are more resistent being only lightly affected by pH 8.

Summarily, we shall say that the most favourable conditions for St. Louis encephalitis virus in HeLa cells are: temperature of 37 °C, medium containing an association of serum with yeast extract, and pH 7.

As regards St. Louis encephalitis virus in Human Amnion cells, favourable factors are: temperatures of 37 °C or 39 °C, medium VII, and pH 6 and 7.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDJAPARIZDE, O. G.: BOGOMOLOVA, N. N., y ZALKIND, S. Ya. 1963. Vopr. Virusol., 1, 40.
2. CARP, R. I., y KOPROWSKI, H. 1962. Virology, 16, 71.
3. CARP, R. I.; PLOTKIN, S. A.; COHEN, B. I.; LA LIBERTÉ, J., y KOPROWSKI, H. 1963. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 112, 247.
4. CARP, R. I.; PLOTKIN, S. A.; NORTON, T. W., y KOPROWSKI, H. 1963. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 112, 251.

5. HARRISON, R. W., y MOORE, E. 1936. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 35, 359.
6. HARRISON, R. W., y MOORE, E. 1937. Am. J. Pathol., 13, 361.
7. KISSLING, R. E. 1957. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 290.
8. LWOFF, A. 1959. Bacteriol. Rev., 23, 109.
9. MOLLOY, E. 1940. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 44, 563.
10. POLLARD y colaboradores. 1954. Texas Rep. Biol. Med., 12, 336.
11. RAPPAPORT, C., y MELNICK, J. L. 1957. Federation Proc., 16, 429.
12. REED, L. J., y MUENCH, H. 1938. Am. J. Hyg., 27, 493.
13. SCHERER, W. F., y SYVERTON, J. T. 1954. Am. J. Pathol., 30, 1.057.
14. SCHULTZ, E. W.; WILLIAMS, G. F., y HETHERINGTON, A. 1938. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 38, 799.
15. SYVERTON, J. T., y BERRY, G. P. 1935. Science, 82, 596.
16. STULBERG, C. S.; BERMAN, L., y PAGE, R. H. 1956. Virology, 2, 844.
17. WEBSTER, L. T., y JOHNSON, M. S. 1941. J. Exptl. Med., 74, 489.

C. S . C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

ALGUNOS FACTORES QUE AFECTAN A LA MULTIPLICACION DEL VIRUS DE LA ENCEFALITIS JAPONESA B CULTIVADO EN CELULAS HELA Y DE AMNIOS HUMANO (*)

por

M.ª DEL PILAR VILAS

INTRODUCCION

En diversos trabajos sobre el comportamiento del virus de la encefalitis Japonesa B durante su multiplicación en cultivos celulares, se menciona el hecho de que los efectos citopáticos causados en las células por el virus son irregulares, pero no se concretan las causas de este fenómeno.

Es posible que la interacción virus-célula y, por tanto, la síntesis del virus esté influida no sólo por las características peculiares de las células y del virus, sino también fundamentalmente por factores metabólicos derivados de la presencia, ausencia o déficit de ciertas sustancias en el medio de cultivo; la temperatura de incubación y el pH influyen también con toda probabilidad.

El virus de la encefalitis Japonesa B es capaz de multiplicarse en muchos tipos de células, sin causar en ellas fenómenos citopáticos claros. Según Masson (3), esta característica se pone sólo de manifiesto empleando células HeLa y sólo en los tres o cuatro primeros pases.

(*) Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de la autora y ha sido realizado, en unión de otros varios, mediante una Ayuda (FG-Sp-122) del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos.

Cuadro 2. Influencia de diferentes temperaturas sobre la infección de célulasHeLa con EJB

Grados centígrados	Virus	2 días		4 días		5 días		6 días		7 días		10 días		11 días		15 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
39	EJB	0	+ + +	3	+ + + +												
	Testigo		+		+ +												
37	EJB	0	0	4	0		+	4	+ + +	4	+ + +						
	Testigo		0		0		0		0		0						
35	EJB	0	+	3	+ +	3	+ + +										
	Testigo		0		0		0										
28	EJB	1	0	0	0		0	1	0		0	4	+ +	4	+ + +		
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		
20	EJB	0	0	0	0		0	0	0		0		0	0	0	0	0
	Testigo		0		0	0	0		0		0		0		0		0

Se inoculan cuatro ratones con cada muestra de medio.

R_m = ratones muertos. A_c = aspecto de las células. 0 a + + + = proporción de células con efectos citopáticos, en el cultivo. + + + + = destrucción completa del cultivo.

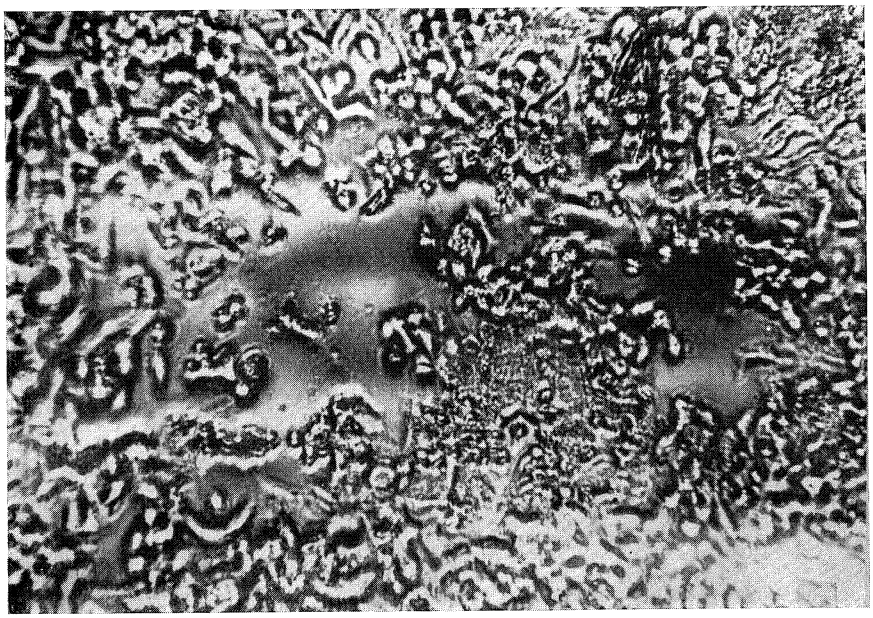


Figura 1. Células HeLa infectadas con EJB. Pase 4.º

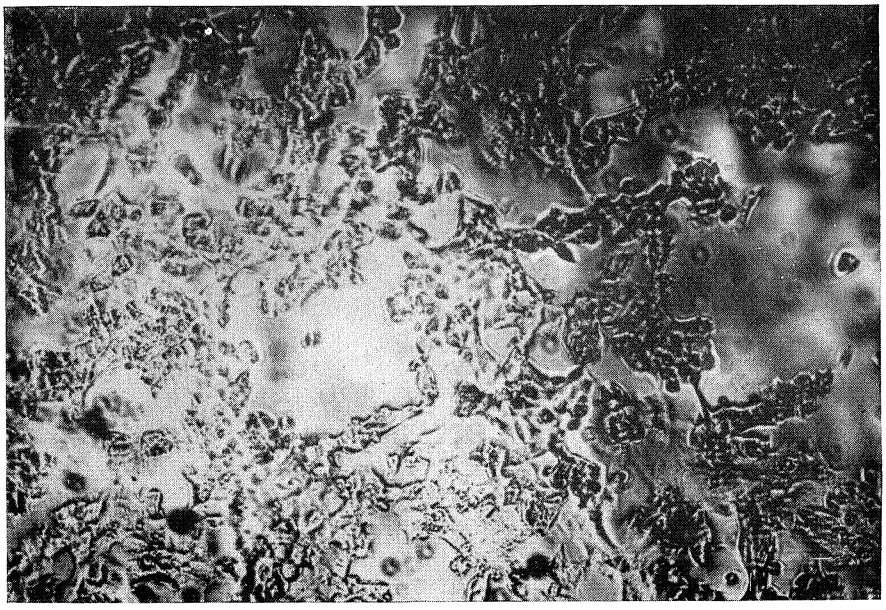


Figura 2. Células AH infectadas con EJB. Pase 4.º

peraturas estudiadas; también observamos que las células infectadas metabolizan el medio mucho más lentamente que los testigos sanos.

b) Células de amnios humano infectadas con encefalitis Japonesa B

Según los datos resumidos en el *cuadro* 3, la evolución de la infección producida por este virus en las células de amnios humano (AH) es considerablemente más lenta que en las células HeLa.

A la temperatura de 39 °C aparecen desde el sexto día síntomas muy débiles de infección; las cantidades de virus no son muy importantes hasta el día décimotercero, en que tiene lugar la destrucción casi total de las células.

No se obtiene una cantidad importante de virus a 37 °C a pesar de la larga duración de los cultivos infectados y no hay efectos citopáticos muy marcados; las células permanecen bastante estabilizadas, sin cambios apreciables.

A la temperatura de 35 °C sólo se observan trazas de virus a los siete días después de la infección; el cultivo degenera luego rápidamente en tres días, sin aumento en la cantidad de virus liberado.

A 28 °C se observa que no puede detectarse virus, y las células aparecen como si su metabolismo estuviera estabilizado; este hecho se prueba por la ausencia de cambios en el pH del medio de mantenimiento.

La temperatura de 20 °C nos permite obtener, aunque en pequeña cantidad, virus a lo largo de todo el experimento; sin embargo, en las últimas muestras de medio de cultivo inoculadas no se observa presencia de virus.

De la comparación entre el aspecto de las células de amnios humano infectadas con encefalitis Japonesa B y el de los testigos sanos, vemos que estos últimos continúan su desarrollo normalmente a 37 y 35 °C, mientras que los cultivos infectados quedan casi totalmente destruidos. A 39 y 20 °C, las células infectadas y los testigos degeneran de forma similar. A 28 °C, la diferencia que existe es muy pequeña.

Influencia de diversos medios de cultivo

a) Células HeLa infectadas con virus de encefalitis Japonesa B (cuadro 4)

Con los medios C, D, E y F se produce una rápida degeneración de los cultivos y no se encuentra prácticamente virus liberado. El medio A

Cuadro 3. Influencia de diferentes temperat

Grados centígrados	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		6 días		7 día	
		Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	
39	EJB		0	0	0		0		0	0	±	2	
	Testigo		0		0		0		0		0		
37	EJB		0	0	0		0	1	0	0	0	1	
	Testigo		0		0		0		0		0		
35	EJB		0	0	0		0		0	0	0	1	
	Testigo		0		0		0		0		0		
28	EJB		0	0	0		+		+		+	0	+
	Testigo		0		0		0		0		0		
20	EJB		0	0	+		+ + +	2	+ + +		+ + +	0	+
	Testigo		0		0		+ + +		+ + +		+ + +		+ +

ıre la infección de células AH con EJB

8 días		9 días		10 días		11 días		13 días		14 días		15 días	
m	A_e	R_m	A_e	R_m	A_e	R_m	A_e	R_m	A_e	R_m	A_e	R_m	A_e
	±		+		+	3	++	4	+++				
	++		++		++		+++		+++				
	++		++	1	++		++	4	++		++	3	++
	0		0		0		0		0		0		0
	+		++	0	+++								
	0		0		0								
	++		++		++		++	0	++		++	0	+++
	+		+		+		+		+		+		+
	++++	0	++++										
	++++		++++										

Cuadro 4. Influencia de diferentes medios de cult

Medios	Virus	2 días		3 días		4 días		5 días		6 días	
		Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	A
Mantenimiento	EJB		0		0	0	+		++	2	+
	Testigo		0		0		0		0		
A	EJB		+	0	+		++	4	++++		
	Testigo		0		+		+		+++		+
B	EJB		+		+	0	+	1	++	3	+
	Testigo		0		0		0		0		
C	EJB		0		++	0	+++	0	++++		
	Testigo		0		0		+++		++++		
D	EJB		++	0	++	0	+++++				
	Testigo		+		+++		+++				
E	EJB		0		+		+	0	++++		
	Testigo		0		0		0		+++		
F	EJB		0	0	+	1	++	0	++++		
	Testigo		0		+++		+++		++++		
VI	EJB	0	+		+	4	++		++	1	+
	Testigo		0		0		0		0		
VII	EJB	3	0		0	4	+		+	2	
	Testigo		0		0		0		0		

ırante la adsorción del virus EJB por células HeLa

7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días		13 días	
ım	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac
ı	+++												
	0												
2	++++												
	+												
	++	4	++	3	+++	4	+++	3	+++	4	+++	4	++++
	0		++										
	++	4	+++	4	++++								
	0		0		0		0		0		0		

acorta el período evolutivo de la infección, con una escasa producción de virus. Los medios de mantenimiento y B que determinan un período evolutivo medio, no liberan gran cantidad de virus. El medio VII es aceptable, tanto por la duración del cultivo como por la proporción de virus liberado. Finalmente, el medio VI resulta ser el óptimo en este caso, ya que el cultivo llega a tener una duración de trece días, con cantidad considerable de virus liberado a partir del octavo día.

A través de los resultados obtenidos de la comparación de los cultivos infectados con los testigos se deduce que en los medios A, C, D, E, y F la degeneración de los cultivos infectados es paralela a la de los testigos. Con los medios B, VI y VII y de mantenimiento, los testigos permanecen inalterados, mientras que las células infectadas degeneran, coincidiendo su degeneración con la aparición en el medio de virus liberado.

b) Células de amnios humano infectadas con encefalitis Japonesa B (cuadro 5)

Utilizando el medio de mantenimiento, después de seis días de la inoculación, se empiezan a notar efectos citopáticos en el cultivo y también aparecen pequeñas cantidades de virus que van aumentando de forma progresiva, paralelamente a la degeneración celular; ambos fenómenos alcanzan su máximo a los once días después de la inoculación.

Con los medios A, D y F se provoca una degeneración muy rápida de las células sin liberarse virus detectable.

Empleando el medio B, no se observan efectos citopáticos muy marcados en los cultivos mantenidos con este medio; a los doce días después de la inoculación, las células presentan un aspecto completamente normal, y a los trece días, empiezan a aparecer muy lentamente los síntomas de infección y los cultivos no degeneran hasta los días 19, 20 y 21; en este último día es completa la destrucción de las células. De los datos obtenidos referentes a la liberación de virus, deducimos que existen cantidades variables de virus en el medio a partir del segundo día, siempre en considerable proporción. Entre el cuarto y el séptimo día hay un lapso en el que no se encuentra virus libre.

Con el medio C, la cantidad de virus liberado durante el tiempo de la infección celular no es muy significativa. Los efectos citopáticos empiezan a aparecer después de siete días, continuando estacionarios hasta

Cuadro 5. Influencia de diferentes medios de cultivo sobre la infección de células AH con EJB

Medios	Virus	2 días		3 días		4 días		5 días		6 días		7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días		13 días		14 días		15 días		16 días		17 días		18 días		19 días		20 días		21 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
Mantenimiento	EJB	0	0		0		0	1	0		+	1	+		++	3	++	3	+++	4	++++																		
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0																		
A	EJB		+		+++	0	++ ++																																
	Testigo		+		+		++ ++																																
B	EJB		0	3	0		0		0	0	0	0	0	3	0		0	4	0		0		0	3	+		+	3	+		+	3	+	4	+		++	3	++	4	++ ++ 0
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		
C	EJB		0		0	0	0		0	0	0	0	0	0	0		0	0	0	1	0		0		0	0	+		+	4	+		+	4	+		++	4	++ ++ 0		
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		
D	EJB	0	0	+	0	++ ++																																	
	Testigo	+		+++		++ ++																																	
E	EJB	0		0	0	0		0	2	0		++	1	++		++	0	++		++	1	++ ++ +																
	Testigo	0		0		0		0		0		0		0		+		+		+																		
F	EJB	0	0	0		+	0	++ ++																															
	Testigo	+		++		++		++ ++																															
VI	EJB	0		0	1	0		0	0	0	1	+		+	3	++	4	++	4	++++																		
	Testigo	0		0		0		0		0		0		0		0		0		++		++		++		++		++										
VII	EJB	0	0	0		0		0	0	0	0	0	0	0	3	0		0	1	0		0	2	0		+	1	+	3	++								
	Testigo	0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0		0								

el día 12, que es cuando los últimos restos del epitelio celular se han destruido.

Con la utilización del medio VI, la liberación del virus y la aparición de efectos citopáticos son simultáneos; desde el séptimo día después de la inoculación, la proporción de virus aumenta más rápidamente los días 10 y 11, resultando entonces letal para todos los ratones inoculados.

Si empleamos el medio VII, no aparecen efectos citopáticos en el cultivo hasta el día 14; este día y el 15 los hay muy ligeros, mientras que el día 16 hay un desprendimiento total del epitelio celular.

La proporción del virus liberado durante este período es muy variable, aunque no es nunca suficiente para causar la muerte de todos los ratones.

En el *cuadro* 5 están resumidos los resultados obtenidos de la comparación de las células infectadas con los testigos y vemos que con los medios A, D y F, la destrucción de los cultivos infectados es paralela a la de los testigos. Con los medios B, C, VI y VII y mantenimiento existe una gran diferencia entre ambos, ya que mientras que los testigos no muestran alteraciones, las células infectadas sí tienen efectos citopáticos. Con el medio E, los testigos presentan síntomas de degeneración, aunque mucho menos intensos que los que aparecen en los cultivos infectados.

Influencia de varios pH sobre la infección celular

a) Células HeLa infectadas con encefalitis Japonesa B

La aparición de los efectos citopáticos y su intensidad es bastante similar en los cultivos sometidos a los pH 6, 7 y 8. Este último lleva consigo una reducción del período evolutivo de la infección y una mayor proporción de virus liberado *(cuadro 6)*.

También observamos que los testigos no infectados permanecen prácticamente inalterados a los pH 6 y 7, mientras que los cultivos infectados empiezan a mostrar síntomas de degeneración desde el primer día; el pH 8 es desfavorable y, por tanto, ambos cultivos, el infectado y el testigo, presentan síntomas degenerativos, aunque muy ligeramente menos marcados en los testigos.

Cuadro 6. Influencia de diferentes pH durante la adsorción del virus EJB por células HeLa

pH	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		6 días		7 días		8 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c
6	EJB		±	0	+		++		+++	2	+++		+++	3	++++
	Testigo		0		0		0		0		0		+		+
7	EJB		+	0	++		++	0	+++	2	+++		+++	2	++++
	Testigo		0		0		0		0		0		0		0
8	EJB		0	0	++		+++	3	+++	4	++++				
	Testigo		0		0		+		++		++		++		++

b) Células de amnios humano infectadas con encefalitis Japonesa B

Como ya se ha mencionado en anteriores experimentos, las células de amnios humano han resultado más resistentes a la infección y a los diversos pH probados. A pH 6 y 7, los cultivos muestran síntomas de infección cinco días después de la inoculación y se encuentran cantidades variables de virus desde este mismo día, siendo la máxima a pH 6. A pH 8, el cultivo se destruye más rápidamente y la producción de virus es similar a la del pH precedente *(cuadro 7)*.

Los testigos sometidos a los pH 6 y 7 evolucionan normalmente, mientras que a pH 8 presentan síntomas de degeneración.

DISCUSION

Al realizar el estudio de la termorresistencia del virus, se deduce que su sensibilidad a la mayoría de las temperaturas estudiadas (39, 37, 35 °C) es elevada, desapareciendo el virus a las veinticuatro horas; a 28 y 20 °C, el virus es más resistente a la inactivación, siendo su duración de más de cuarenta y ocho horas a la última temperatura. Como ya se ha determinado en el curso de un trabajo precedente, el comportamiento de los virus de las encefalitis de San Luis y Japonesa B es similar a las mismas temperaturas, aunque el segundo es en general más termorresistente.

Observando la influencia de la temperatura sobre el cultivo en células del virus EJB, Rohitayodhin y Hammon (5 y 6) han encontrado que cultivando la misma estirpe de virus que nosotros, a 30 °C, los efectos citopáticos aparecen más tarde y tienen una evolución más lenta; cuando empiezan esos efectos, aparecen altos títulos de virus. Y también que el virus cultivado en células de riñón de hamster durante 20 pases a 24 °C, pierde poder infectivo y virulencia para el ratón inoculado por vía subcutánea.

Nosotros hemos determinado con una cierta escala de temperaturas que la influencia de la temperatura sobre el complejo virus-célula es evidente.

La mayor proporción en la liberación del virus en el medio se obtiene cuando se cultiva el virus en células HeLa a 37 y 28 °C; esta producción es menor a 35 y 39 °C (lo cual indica que las condiciones son menos

Cuadro 7. Influencia de diferentes pH dura

pH	Virus	1 día		2 días		3 días		4 días		5 días		6 días	
		R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	A_c	R_m	
6	EJB		0		0	0	0		0		+	3	
	Testigo		0		0		0		0		0		
7	EJB		0		0	2	0		0		+	2	
	Testigo		0		0		0		0		0		
8	EJB		0		0	2	0		0		0	1	
	Testigo		0		0		0		0		0		

tiempo de adsorción del virus EJB por células AH

7 días		8 días		9 días		10 días		11 días		12 días		13 días		14 días	
Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac	Rm	Ac
	+	0	++		++	1	+++		+++	4	++++				
	0		0		0		0		0		0				
	+	0	+		+	0	++		++	1	+++				+++
	0		0		0		0		0		0		0		0
	+	2	+++		+++	3	++++								
	0		0		+		+								

favorables para la proliferación del virus), y no existe a 20 °C. Cuando se cultiva en células de amnios humano, los resultados son algo diferentes de los obtenidos en células HeLa; la temperatura más favorable es 37 °C, seguida por 39 y 35 °C; y encontramos una ligera proliferación del virus a 20 °C.

Como ya se ha mencionado en un trabajo anterior (7), la temperatura de 39 °C altera las células muy rápidamente, a pesar de lo cual hay una liberación detectable de virus; las células de amnios humano toleran mejor esta temperatura desfavorable. La diferencia entre el comportamiento de las diversas clases de células utilizadas parece indicar que la temperatura actúa principalmente sobre el substrato celular, influyendo en él y modificando el proceso de síntesis del virus.

Comparando los resultados obtenidos en el trabajo ya citado (7), llevado a cabo con encefalitis de San Luis en las mismas condiciones, comprobamos que el virus de la encefalitis Japonesa B tiene mayor virulencia que aquél.

Los diferentes medios de cultivo tienen naturalmente una gran influencia sobre el complejo virus-célula. Los resultados obtenidos para el virus EJB son bastante parecidos a los obtenidos en el caso del virus ESL cultivado en los mismos tipos de células. Teniendo en cuenta la liberación de virus EJB, resulta favorable el medio VI (con una pequeña proporción de suero, 1 por ciento), pero conteniendo albúmina bovina; es también bastante conveniente el medio VII, que contiene una considerable proporción de suero (10 por ciento) y extracto de levadura. Este hecho prueba que la albúmina bovina y el extracto de levadura añadidos al medio, aportan a las células factores favorables para la síntesis del virus.

Las células de amnios humano se comportan de forma diferente a las HeLa; con los medios de mantenimiento y B inducen a una larga evolución de la infección celular que no es fácilmente explicable, así como más elevadas cantidades de virus.

Hay cienta analogía entre los resultados obtenidos con los medios VI y VII para el virus EJB, comparándolos con los procedentes del experimento llevado a cabo con el virus ESL (7) cultivado en células de amnios humano; no obstante, con el medio VII, el período evolutivo de la infección es excepcionalmente largo.

Con los diferentes pH utilizados durante la adsorción del virus por las células, los resultados son similares con ambos tipos de ellas, siem-

pre con el ya observado retraso en el caso de las de amnios humano. Comparando con los resultados obtenidos anteriormente con el virus ESL, encontramos que el pH 8 es más favorable para el virus de la EJB que para aquél.

RESUMEN

Resulta más virulento el virus EJB cuando se cultiva en células HeLa que en las de amnios humano, ya que en éstas parece que encuentra una mayor resistencia y el período evolutivo de la infección es generalmente más largo.

La asociación del suero y albúmina bovina en el medio es la más favorable para la multiplicación de este virus.

Los medios sin suero ejercen los mismos efectos sobre el virus tanto si se cultiva en células HeLa como en amnios humano; los restantes medios observamos que ejercen una influencia semejante a la encontrada en el caso de la encefalitis de San Luis (7); siendo extraordinariamente largo el período evolutivo de la infección obtenido con el medio que contiene suero y extracto de levadura. El medio VII con suero y extracto de levadura es menos efectivo que el B y el de mantenimiento, los cuales tienen cantidades diferentes de suero, pero carecen de extracto de levadura.

Para determinar la influencia que tiene el pH sobre la adsorción del virus por las células se han probado los pH 6, 7 y 8, con el resultado de que la adsorción a pH 8 es la más favorable para este virus.

Para el virus de la encefalitis Japonesa B cultivado en células HeLa, son más favorables las temperaturas de 37 y 28 °C, el medio que contiene la asociación de suero y albúmina bovina (medio VI) y la adsorción a pH 8; cuando se cultiva en células de amnios humano, el óptimo resulta la temperatura de 37 °C, el medio VI con suero y albúmina bovina, y la adsorción a pH 8.

Agradecemos a la señorita María del Carmen Granados su valiosa ayuda técnica en la realización de este trabajo.

SUMMARY

With respect to the proliferation of Japanese B encephalitis virus, most favourable temperatures are 37 °C and 28 °C in HeLa cells and 37 °C in Human Amnion.

JBE virus is most virulent when cultivated in HeLa cells; when cultivated in Human Amnion cells, it encounters a greater resistence, the evolutive periode of the infection being generally longer.

Association of serum with bovine albumin is highly favourable for JBE virus.

Media without serum have the same effects upon JBE virus cultivated in HA cells as if cultivated in HeLa. The remaining media have the same influence as in the case of St. Louis encephalitis in Human Amnion; attention is to be called on the extraordinarily long evolutive period of the infection in the medium containing serum-yeast extract. Medium VII is less effective than B and maintenance.

With a view to determining the influence of the pH upon adsorption of virus on cells, we have tested pH 6, 7, 8, with the result that pH 8 is most favourable for JBE virus.

JBE virus cultivated in HeLa cells is favoured by temperatures of 37 °C or 28 °C, medium containing the association serum-bovine albumin (medium VI) and pH 8.

Optimun for JBE virus cultivated in HA cells are temperature of 37 °C, medium VI and pH 8.

BIBLIOGRAFIA

1. Dierks, F. H., y Hammon, W. M. 1958. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 97, 627.
2. Kissling, R. E. 1957. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 96, 290.
3. Mason, H. C. 1956. Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists), 56, 106.
4. McCallum, R. V., y Folley, J. F. 1957. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 94, 556.
5. Rohitayodhin, S., y Hammon, W. McD. 1962. J. Immunol., 89, 582.
6. Rohitayodhin, S., y Hammon, W. McD. 1962. J. Immunol., 89, 823.
7. Vilas, M. P. 1965. Microbiol. Españ., 18, 49.

C. S. I. C.
INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO PRELIMINAR DEL FENOMENO DE INFECCION PERSISTENTE PRODUCIDO EN CELULAS HELA Y DE AMNIOS HUMANO POR LOS VIRUS DE LAS ENCEFALITIS DE SAN LUIS Y JAPONESA B (*)

por

M.ª DEL PILAR VILAS

INTRODUCCION

Hauduroy (8) llama la atención de los investigadores sobre la posible existencia en distintos seres vivos, tanto animales como vegetales, de ciertos virus, sin que la presencia de éstos provoque ninguna reacción aparente en el huésped; y da a estos virus el nombre de virus latentes *(virus endormis)*.

Quizá uno de los más interesantes descubrimientos realizados en los últimos años, desde que se ha extendido el uso del cultivo de células epiteliales obtenidas por tripsinización del riñón del mono, ha sido el hallazgo de numerosos virus en cultivos realizados a partir de órganos de animales aparentemente sanos; la presencia de estos virus se ha observado debido a que los cultivos presentaban efectos citopáticos característicos de infección por virus.

Más tarde, diversos autores han observado que cultivos de células infectadas experimentalmente por virus no presentaban efectos citopáticos, manteniéndose aparentemente normales durante ciertos períodos de tiem-

(*) Este trabajo forma parte de la tesis doctoral de la autora y ha sido realizado, en unión de otros varios, mediante una Ayuda (FG-Sp-122) del Ministerio de Agricultura de Estados Unidos.

po, aunque se demuestra la existencia de una infección en el interior de las células.

Nosotros hemos observado un fenómeno en anteriores trabajos, que consiste en la aparición de células que se mantienen aparentemente normales en cultivos infectados por los virus de la encefalitis de San Luis y y Japonesa B, pero que mantienen y transmiten la infección. Dicho fenómeno se ha observado en células HeLa y de amnios humano. Hemos abordado su estudio y los primeros resultados obtenidos se presentan en este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Virus

Cepa Webster, de la encefalitis de San Luis (ESL), y cepa Nakayama, de la encefalitis Japonesa B (EJB).

Células

Cepas HeLa y de amnios humano (AH) (*).

Animales

Ratones blancos jóvenes, de 18-22 g. Se inoculan por vía intracerebral con 0,03 ml de la suspensión de virus.

Medio de crecimiento

Se emplea el medio I, descrito en un trabajo anterior (17).

Medio de Dulbecco, modificado

Solución de Earle (10 ×), 18 %; solución de hidrolizado de lacto-albúmina (al 5 por ciento, en earle), 20 %; albúmina bovina (al 10 por ciento, en earle), 2 %; penicilina, 100 U.I./ml; estreptomicina, 100 μg/ml; rojo neutro (al 0,2 por ciento), 2 %; bicarbonato (al 4,4 por ciento), 10 %; agua bidestilada, hasta 100 ml.

En el momento de su utilización, se mezcla este medio a volúmenes iguales con agar noble de Difco al 3 por ciento y fundido a una temperatura que no debe ser superior a los 43 °C, cuando se vaya a echar sobre el cultivo.

(*) Suministadas por Italdiagnostic (Roma).

Método de las placas de Dulbecco, modificado

En este método se utilizan para el cultivo de las células matraces de Erlenmeyer de vidrio pyrex de 100 ml de capacidad y que tengan el fondo lo más plano posible.

Se hace la siembra de las células en los matraces y añadiendo el medio de crecimiento se colocan a 37 °C, hasta que se haya formado el epitelio celular continuo; entonces se hace la inoculación del virus, dejándolo el tiempo de adsorción necesario, con un adecuado margen de seguridad, según la cepa de virus. Una vez adsorbido el virus, se elimina el sobrante lavando con solución de Hanks tres veces y se añaden 5 ml del medio de Dulbecco modificado para placas, a una temperatura de 43 °C, pero sin sobrepasarlos, para que forme una capa sólida sobre las células; los matraces se colocan sobre una superficie fría, a cubierto de la luz, para evitar la alteración del rojo neutro que entra en la composición del medio; una vez que el agar está solidificado, se llevan los matraces a la estufa a 37 °C, colocándolos en unas bandejas especiales en las que quedan en posición invertida, con la base hacia arriba.

Persistencia de la infección celular

Frascos con cultivo en epitelio continuo, de las cepas de células, se inoculan respectivamente con los virus a experimentar, añadiendo medio de crecimiento igual para las dos cepas.

Las células supervivientes a la infección han seguido multiplicándose normalmente, igual que las células no inoculadas.

Se han ido recogiendo muestras del medio de cultivo y se han inoculado intracerebralmente a ratones, para determinar en qué períodos de tiempo existía virus libre en el medio y establecer la relación entre el aspecto del cultivo celular y la liberación de virus. Cuando los frascos del cultivo están con las células formando una capa continua, tripsinizan éstas y se distribuyen en otros frascos, continuándose su cultivo.

Experimento sobre persistencia mediante el método de Dulbecco, modificado

Células de las dos cepas, procedentes del experimento de persistencia, es decir, infectadas, pero con apariencia normal mantenida, se han cultivado en matraces de Erlenmeyer de fondo plano, con medio de cre-

cimiento; cuando ya se ha formado la capa monocelular continua, se retira el medio de crecimiento y se añade en su lugar medio de Dulbecco modificado, a una temperatura no superior a 43 °C y en suficiente cantidad para que cubra el cultivo.

Cuando el medio se ha solidificado, se colocan a 37 °C y se observa diariamente la evolución del cultivo.

Exactamente igual se hace con un testigo de células sanas de las dos cepas, para que sirva de comparación.

RESULTADOS

Se resumen los datos obtenidos (véanse *cuadros 1-2)* de la observación durante seis meses del fenómeno de la persistencia de la infección en células HeLa infectadas con los dos virus; y durante un período de

Cuadro 1. Persistencia de la infección celular con ESL

Células HeLa		Células AH	
Días de intervalo entre dos fechas inmediatas	De 4 ratones, muertos	Días de intervalo entre dos fechas inmediatas	De 4 ratones, muertos
33	1	17	0
31	4	43	2
4	3	8	3
2	3	10	1
32	0	5	3
3	0	7	4
3	0		
2	0		
4	0		
3	0		
3	4		
2	4		
2	1		
2	2		
3	4		
6	4		
2	3		
11	4		
4	3		
7	4		
2	4		
3	4		
2	2		
4	2		
7	3		

Cuadro 2. Persistencia de la infección celular con EJB

Células HeLa		Células AH	
Días de intervalo entre dos fechas inmediatas	De 4 ratones, muertos	Días de intervalo entre dos fechas inmediatas	De 4 ratones, muertos
33	1	59	1
31	0	8	0
4	2	10	0
34	0		
3	0		
5	0		
4	1		
6	2		
2	0		
2	0		
2	1		
1	0		
1	1		
7	0		
1	2		
12	0		
2	3		
4	2		
2	4		
3	2		

Cuadro 3. Persistencia de la infección celular, en matraces de Erlenmeyer

Días	Células HeLa						Células AH					
	ESL		EJB		Testigo		ESL		EJB		Testigo	
	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D	T	D
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	+ +	0	+ +	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	+ + +	1	+ + +	1	0	0	+	0	0	0	0	0
3	+ + +	2	+ + +	2	+	1	+	0	+	0	0	0
4	+ + +	2	+ + +	2	+	1	+	0	+	1	+	0
5							+ +	1	+ +	2	+	0
6							+ +	1	+ +	2	+	1
7							+ +	2	+ + +	2	+	1
8							+ + +	2				

T = Grados de decoloración de las células. D = Grados de destrucción de las células.

tiempo menor del mismo fenómeno, en células de amnios humanos infectadas con los mismos virus.

Hay períodos de tiempo en los que aparece virus liberado en el medio en cantidad suficiente para causar la muerte a la totalidad de los ratones inoculados, mientras que existen otros períodos en los que no es posible detectar virus en el medio de cultivo.

La aparición de virus en el medio coincide normalmente con alteraciones del cultivo celular, como son retraso en la multiplicación celular y efectos citopáticos que afectan a mayor o menor cantidad de células, quedando siempre un cierto número de éstas con aspecto normal y que continúan su multiplicación sin alteraciones visibles, volviéndose a recuperar la apariencia normal del cultivo durante un nuevo período de tiempo.

Es muy difícil poder obtener placas aisladas, debido a que las células infectadas están muy difundidas en el cultivo de persistencia, sin embargo, se observa *(cuadro 3)* una progresiva decoloración y destrucción de células, lo que indica la presencia y aumento constante de la cantidad de virus en dichas células.

Observamos que en las células HeLa, el comportamiento de los dos virus es semejante entre sí, existiendo una gran diferencia con los testigos, que prácticamente conservan su coloración hasta el final de la experiencia.

En las células de amnios humano sucede lo mismo, pero la evolución del fenómeno consume un período de tiempo doble del anterior.

DISCUSION

La observación realizada durante los experimentos llevados a cabo y principalmente durante el cultivo normal de los virus estudiados sobre las células HeLa y de amnios humano, puso de manifiesto la presencia constante de cierta cantidad de células que permanecían con su aspecto y características normales, y esto nos llevó a pensar en la existencia de un fenómeno de latencia o persistencia de virus en células, sin alteración de éstas. Este fenómeno, ya conocido, no está bien determinado en sus causas.

Ackermann y Kurtz (1) fueron los primeros que observaron este fenómeno de latencia, persistencia o infección crónica en cultivos celu-

lares. En cultivos de células HeLa infectados con virus poliomielítico encontraron células supervivientes a la infección, que no manifestaban efectos citopáticos y que se multiplicaban aparentemente de forma normal; Barski (3) también observó la multiplicación de virus poliomielíticos sin efectos citopáticos generalizados; Kaplan y Melnick (11) demuestran la existencia de multiplicación del virus poliomielítico en células de riñón de mono capuchino, sin efectos citopáticos aparentes; Ginsberg (7) indica la presencia del mismo fenómeno al cultivar una cepa de adenovirus sobre células HeLa mantenidas con un medio de crecimiento muy rico en suero (40 por ciento), dando como posible causa la influencia de éste, que produce una gran vigorización de las células, aumentando su metabolismo y estableciendo una competición que predomina sobre la síntesis del virus.

Vogt y Dulbecco (18), cultivando virus poliomielíticos en células HeLa han obtenido células resistentes a la infección, que no las destruye, utilizando un medio de cultivo con antisuero específico; en ausencia de este suero, reaparece la acción del virus sobre las células, provocando efectos citopáticos, siendo por tanto este fenómeno causado por la acción de los anticuerpos específicos.

Puck y Cieciura (15) han puesto de manifiesto una infección inadvertida en el mismo tipo de células citado, inoculadas con el virus de la enfermedad de Newcastle, demostrando que se debe a un estado de portador durante el cual las células presentan un aspecto semejante a las células infectadas.

Chambers (5) da a conocer la existencia de una prolongada producción de virus en cultivos de células de la cepa L inoculados con virus de la encefalitis equina Oeste, determinando que el aumento de la degeneración celular inicial está en razón inversa de la concentración del virus inoculado; que los cultivos portadores son resistentes a una reinoculación con virus homólogo, y que el estado de portador se pierde después de un tratamiento de las células en dicho estado mediante suero específico antiencefalítico, recuperando entonces estas células su sensibilidad a la nueva inoculación con el virus.

Henle y colaboradores (10) encontraron este fenómeno de infección persistente en los virus de la parotiditis y de la enfermedad de Newcastle, cultivados en varios tipos de células, pudiendo mantener este estado indefinidamente sin necesidad de antisuero específico.

Posteriormente, Henle y colaboradores (11) ponen de manifiesto la

existencia de una infección persistente de virus del polioma en cultivos de células de Earle, L. Dicha infección se manifiesta periódicamente en mayor o menor grado por sus efectos citopáticos. La adición de suero antipolioma consigue curar las células después de algunos meses de tratamiento continuo. No se encuentra interferón.

Beasley y colaboradores (4) describen la existencia de este fenómeno de persistencia en el virus del dengue sobre células KB, determinando que cuando se mantiene durante mucho tiempo este estado de portador, el virus experimenta modificaciones, disminuyendo su virulencia para ratones.

Mayer (12), estudiando el cultivo del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas, sobre células HeLa, obtiene el resultado de que sólo una parte de las células es afectada por efectos citopáticos; el mismo autor, en otro trabajo (13), indica que los efectos citopáticos pueden acentuarse por adaptación y selección de las partículas víricas de los cultivos celulares y que en ellos influyen la sensibilidad celular y los métodos de cultivo empleados; y en otro trabajo posterior (14) expone que cultivando el mismo virus en una cepa de células de epitelio humano (AM-57), se observa también el fenómeno de persistencia con las características de escasa liberación de virus y multiplicación celular lenta, y determina que en el establecimiento de la infección persistente no influye significativamente la multiplicidad de la infección, ni la presencia de anticuerpos neutralizantes.

Schramek y colaboradores (16), cultivando una cepa de amnios humano infectada con el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas obtienen una infección persistente de dichas células, que se manifiesta por la continua liberación de virus al medio de cultivo, acompañada por un retraso de la multiplicación celular, dando como explicación la producción en el cultivo de una sustancia del tipo del interferón.

Andjaparizde y colaboradores (2) registran la existencia de esta infección crónica latente en células de las cepas HeLa y Hep-2, caracterizándose por la ausencia de degeneración celular específica y presencia permanente de virus en las células y medio de cultivo; las células infectadas crónicamente difieren de las sanas en la actividad de multiplicación reducida, depresión de actividad metabólica y alteración de algunas características de crecimiento de las células sobre el vidrio; en otro trabajo posterior determina como necesario el suero para la existencia de este fenómeno, ya que si a las células infectadas crónicamente

se les añade medio desprovisto de suero, no liberan virus y sí lo hacen cuando nuevamente se añade; asimismo, indican que el virus liberado por las células que sufren el citado fenómeno, posee algunas características diferentes a las del original, como son: actividad reducida para el ratón inoculado por vía periférica y aumento de su actividad destructiva para los cultivos celulares.

Daniel y Chany (6) enumeran algunas hipótesis para explicar el fenómeno: una de ellas se funda en la selección de células resistentes al efecto citopático; otra, en la producción de partículas de virus incompleto que interferiría con las partículas de virus completo; otra, fundada en la existencia de inhibidores que actúan sobre la multiplicación del virus, de tipo extracelular (suero, medios nutritivos, pH, etc.) o intracelulares (interferón). Según estos mismos autores, las células podían infectarse mutuamente, o bien únicamente se transmite la infección de las células madres a las hijas. De los experimentos por ellos realizados deducen que el virus se encuentra indefinidamente en la célula y ésta lo transmite a las células hijas; como asimismo que la existencia de suero inmune no disminuye la capacidad de las células para producir virus.

Por nuestra parte hemos observado cierta periodicidad en el comportamiento de dichas células, que del estado normal aparente pasan a un estado anormal, presentando retardo en la multiplicación celular y a veces pronunciados efectos citopáticos más o menos difundidos y liberación de virus en cantidad elevada, volviendo más tarde a su estado normal. Esto, en primer lugar, nos hace pensar en un fenómen cíclico del virus, de las células o de ambos, por una parte o por la acción de algún factor externo que actúe sobre las células o el complejo virus + célula. Como es natural, determinar la existencia del factor (o factores) que provocan el fenómeno es un problema difícil de resolver. Se hallan en curso experimentos con los cuales intentamos resolver o aclarar algunos puntos sobre estas cuestiones, sin olvidar la posible acción del interferón.

Teniendo en cuenta que por medio de la técnica de las placas de Dulbecco podríamos confirmar la existencia de células infectadas, aunque de aspecto normal, y su posterior evolución, realizamos un experimento que demuestra que las células, en su mayor parte vivas y normales, van perdiendo el colorante vital añadido a medida que pasa el tiempo, produciéndose zonas decoloradas cada vez más grandes debidas a la extensión

de la infección y su manifestación externa. La evolución sigue las líneas conocidas de mayor resistencia en las células de amnios humano, siendo bastante semejante para los dos virus dentro de cada especie celular.

De los datos mencionados en este trabajo, únicamente podemos deducir que el fenómeno de persistencia de la infección existe en las células HeLa y de amnios humano infectadas con estos virus.

RESUMEN

Hemos observado en los cultivos de células HeLa y de amnios humano infectadas con virus de la encefalitis de San Luis y Japonesa B, respectivamente, la existencia del fenómeno de latencia, persistencia o infección crónica, determinándose la existencia de períodos en los que las células aparentemente normales producen virus y muestran características de infección, y otros períodos en los que las células se comportan como células sanas y normales.

Agradecemos a la señorita María Luisa Rodríguez su valiosa ayuda técnica en la realización de este trabajo.

SUMMARY

In HeLa and Human Amnion cells infected with St. Louis encephalitis virus and Japanese B encephalitis virus, we have remarked the existence of the phenomenum of latency, persistence or chronic infection; we have ascertained the existence of periods when apparently normal cells produce virus and show symptoms of infection and another periods when cells behave as health and normal ones.

BIBLIOGRAFIA

1. Ackermann, W. W., y Kurtz, H. 1955. J. Exptl. Med., 102, 555.
2. Andjaparizde, O. G.; Bogomolova, N. N., y Zalkind, S. Ya. 1962. Vopr. Virusol., 6, 650.
3. Barski, G. 1957. Science, 125, 448.
4. Beasley, A. R.; Lischiter, W., y Sigel, M. M. 1961. Arch. Ges. Virusforsch., 11, 672.

5. CHAMBERS, V. C. 1957. Virology, 3, 62.
6. DANIEL, P., y CHANY, C. 1962. Can. J. Microbiol., 8, 709.
7. GINSBERG, H. S. 1957. *En* Symposium on latency and masking viral and rickettsial infections, 157.
8. HAUDUROY, P. 1952. Rev. Immunol., 16, 222.
9. HENLE, G.; DEINHARDT, F.; BERGS, V. V., y HENLE, W. 1958. J. Exptl. Med., 108, 537.
10. HENLE, G.; HARRY, G. H., y HENLE, W. 1963. J. Natl. Cancer Inst., 31, 125.
11. KAPLAN, A. S., y MELNICK, J. L. 1955. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 90, 562.
12. MAYER, V. 1962. Acta Virol., 6, 92.
13. MAYER, V. 1962. Acta Virol., 6, 230.
14. MAYER, V. 1962. Acta Virol., 6, 317.
15. PUCK, T. T., y CIECIURA, S. J. 1957. *En* Symposium on latency and masking viral and rickettsial infections, 74.
16. SCHRAMEK, S.; MAYER, V., y ZEMLA, J. 1962. Acta Virol., 6, 285.
17. VILAS, M. P. 1965. Microbiol. Españ., 18, 49.
18. VOGT, M., y DULBECCO, R. 1958. Virology, 5, 425.

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIO CITOLOGICO, CURVA DE CRECIMIENTO Y CONSUMO DE GLUCOSA DEL *AEROBACTER AEROGENES* IRRADIADO

por

L. C. VERNA, TERESA S. DE DAURAT y M.ª EUGENIA GRELA

INTRODUCCION

Continuando en el presente trabajo con el estudio de la acción que ejercen distintas radiaciones sobre el *Aerobacter aerogenes* (1 y 10), hemos estudiado la producción de modificaciones en la curva de crecimiento del microorganismo irradiado con luz ultravioleta distinto número de veces, comparando la curva obtenida con la del microorganismo testigo. Simultáneamente, se determinó el consumo de glucosa (única fuente de carbono del substrato) en las distintas fases de la curva de crecimiento de los microorganismos irradiados, así como también el consumo del *A. aerogenes* no sometido a la irradiación.

Durante todas las experiencias se efectuó el estudioo citológico comparativo de los microorganismos testigos y de los irradiados.

MATERIALES Y METODOS

El microorganismo utilizado fue el *Aerobacter aerogenes*. Como medio de cultivo se empleó el M 9 Kelner (3), que es un medio mineral básico, cuya única fuente de carbono es la glucosa y su fuente de nitrógeno es el amonio.

Para la irradiación ultravioleta se empleó un tubo de la «General

Electric», de 15 *W*, que emite una longitud de onda de 2.539 Å.

La intensidad de las radiaciones ultravioletas emitidas por el tubo se midió con un aparato Westinghouse, con un fototubo WL 775.

Para la valoración de la glucosa se utilizó el método de Somogy (7 y 8).

La irradiación se efectuó en las mismas condiciones que en nuestros citados trabajos, sometiendo a los microorganismos suspendidos en solución tamponada, a la acción de la luz ultravioleta, con una energía de 40.000 a 50.000 erg. cm^2/s, que mata más del 99 por ciento de las células así tratadas.

Los cultivos, en M 9, con 6-8 $\times$ 10^8 microorganismos/ml, diluidos a 10^{-2} en solución tampón de fosfatos, a un pH de 7,2, se sometieron, en cápsula de Petri, a la acción de las radiaciones ultravioletas, agitando durante cincuenta segundos a una distancia de 30 cm del tubo. En estas condiciones, los microorganismos reciben de 40.000 a 50.000 erg. cm^2/s, intensidad suficiente para matar más del 99 por ciento de las células sometidas a su acción.

Las células sobrevivientes se sembraron en M 9 (0,10 del líquido irradiado) en 10 ml de medio; este cultivo de veinte horas, resultante de la multiplicación de los sobrevivientes a la irradiación, se sometió, en las mismas condiciones, a la acción de las radiaciones ultravioletas, y así sucesivamente hasta conseguir los cultivos que denominamos 1, 8 y 12 y que corresponden:

1: cultivo normal testigo, sin ser sometido a irradiación.

8: cultivo de *A. aerogenes*, sometido 8 veces a irradiación.

12: cultivo de *A. aerogenes*, sometido 12 veces a irradiación.

Estos cultivos, 1, 8 y 12, se sembraron en matraces conteniendo 250 ml de medio M 9. Se determinó durante dos meses la curva de crecimiento a 37 °C, por siembra de diluciones apropiadas, en cápsulas de Petri con caldo + agar; se efectuó el recuento de colonias correspondientes a unidades viables, después de cuarenta y ocho horas de incubación.

Los recuentos se efectuaron simultáneamente en los tres cultivos a las 0, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 h; 7 y 15 días, 1 y 2 meses.

En los mismos tiempos se determinó la glucosa en los cultivos normales testigos y en los irradiados, hasta llegar a la utilización total del azúcar.

Estudio citológico

De una suspensión bastante densa de microorganismos, se toman 0,10 ml, que se extienden con espátula de Drigalsky sobre medio agar + cerebro + corazón (Difco). Se lleva a estufa a 37 °C, y a las dos horas de incubación, es decir, al final del período de aclimatación y al iniciar la fase logarítmica, se procede a realizar las preparaciones por impresión.

Con bisturí estéril se cortan del medio de cultivo cuadrados de 1 cm de lado, los que, asépticamente, se colocan sobre portaobjetos, con la superficie del desarrollo hacia arriba. Luego, con cuidado de que no haya deslizamientos, se aplica sobre dicha superficie otro porta o cubreobjetos, en forma tal que la mayor parte de las bacterias quede adherida al cubre o portaobjetos aplicado; se dejan secar al aire, se fijan y se colorean, previa hidrólisis.

Empleamos la técnica de Piekarski-Robinow (4-6 y 9). La hidrólisis del ácido ribonucleico se llevó a cabo con ClH N, y procedimos de la siguiente forma: las impresiones en porta o cubreobjetos se someten en un recipiente cerrado, durante tres minutos, a vapores de una solución de ácido ósmico al 2 por ciento (con este fijador hay que tomar precauciones por lo nocivo que es para la vista). Los preparados, aún húmedos, se sumergen en alcohol de 70°, donde pueden permanecer todo el tiempo que se desee, sin ningún inconveniente; cuando se desea colorearlos, se retiran del alcohol, se lavan con cuidado con agua destilada y se efectúa la hidrólisis con ClH N durante diez-veinte minutos, a una temperatura de 60 °C. Luego, los preparados se lavan suavemente con agua y se colorean con solución de Giemsa diluida (1 gota del colorante/ml de agua) durante veinte minutos; o bien con fucsina básica al 0,05 por ciento durante treinta segundos, filtrando previamente la solución. Se lavan las preparaciones y se observan con objetivo de inmersión.

También efectuamos la hidrólisis del ácido ribonucleico con ribonucleasa, según Tulasne y Wendrely (11). Como el ácido ósmico como fijador, se elimina mal durante el lavado previo a la hidrólisis e inhibe la acción enzimática, para evitar este inconveniente, se emplean fijadores a base de formol. El elegido en nuestro trabajo es el de Chabaud: alcohol de 80°, 600 ml; ácido fénico, 150 ml; formol al 40 %, 50 ml; ácido acético, 20 ml.

El fijador se hace actuar durante diez minutos; para eliminar el

fijador los preparados se lavan cuidadosamente con agua y a continuación se someten a la acción de una solución al 1 por ciento de ribonucleasa (*).

La enzima se hizo actuar a 60 °C durante tiempos de quince a sesenta minutos. Para nuestra enzima hemos obtenido los mejores preparados con el tiempo de cuarenta minutos. La temperatura, los tiempos de acción y la concentración de la enzima deben ser previamente establecidos para cada especie microbiana, y de acuerdo con la enzima empleada.

Una vez hidrolizado el ARN por la enzima, se lavan con cuidado las preparaciones y se colorean con solución de Giemsa o de fucsina, como en la técnica anterior; se observan y se obtienen las fotomicrografías correspondientes.

RESULTADOS

En la *figura 1* se observan las curvas de crecimiento de los cultivos 1, 8 y 12.

En las *figuras 2-4* se presentan las curvas de crecimiento y de consumo de glucosa de los cultivos 1, 8 y 12. En las ordenadas se especifican los tiempos de los cultivos y en las abcisas el logaritmo del número de microorganismos y los miligramos de glucosa del medio/ml.

Las figuras 5-7 reproducen las fotomicrografías obtenidas de los cultivos 1, 8 y 12, previa hidrólisis ácida.

En las *figuras 8-10* se presentan las fotomicrografías obtenidas de los cultivos 1, 8 y 12, previa hidrólisis con ribonucleasa.

DISCUSION

Las curvas de crecimiento de los cultivos 1, 8 y 12 *(figura 1)* muestran una fase de adaptación o de latencia, de alrededor de dos horas. Se nota una modificación apreciable en la fase exponencial o logarítmica, que se traduce en un alargamiento de su duración en los cultivos irradiados, principalmente en el 8, con respecto a la curva normal testigo.

En el *cuadro 1* se expresan las diferencias observadas en la fase expo-

(*) La ribonucleasa empleada es de la «Nutritional Biochemicals Corporation».

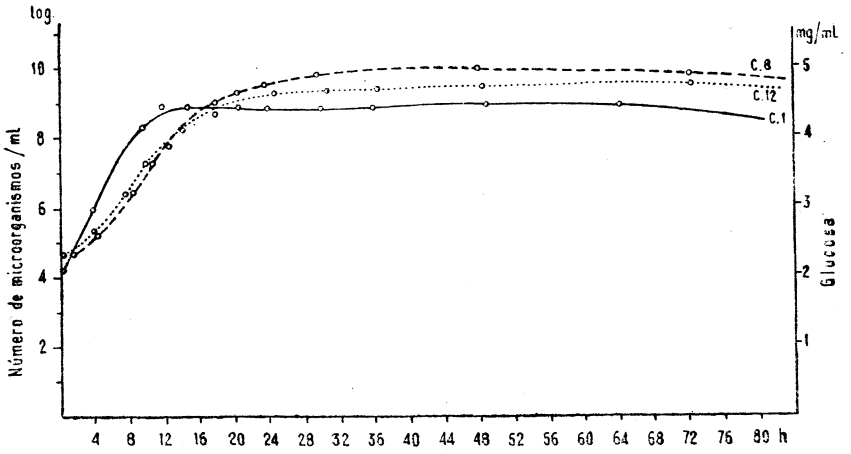


Figura 1. Cultivos 1, 8 y 12. Crecimiento

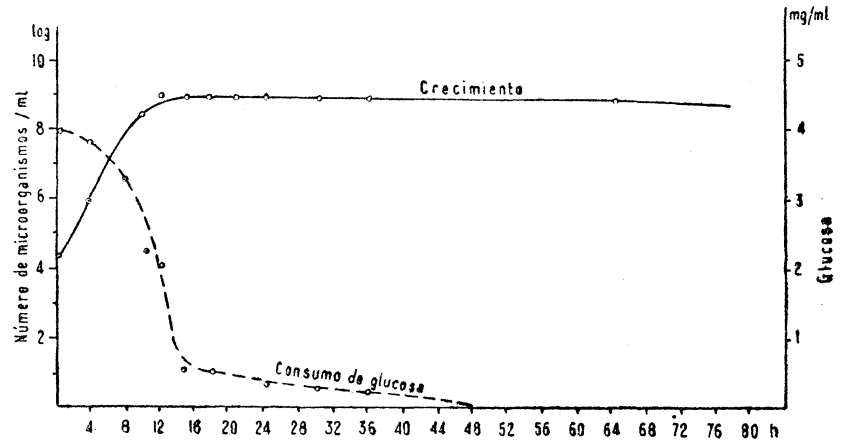


Figura 2. Cultivo 1

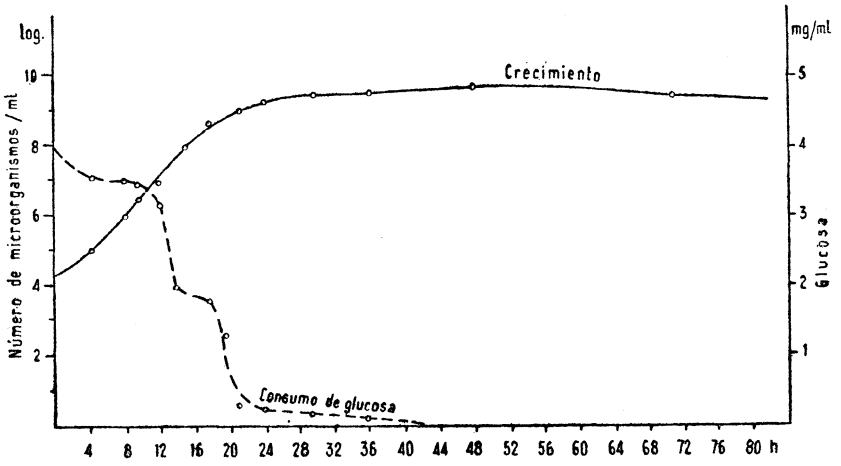


Figura 3. Cultivo 8

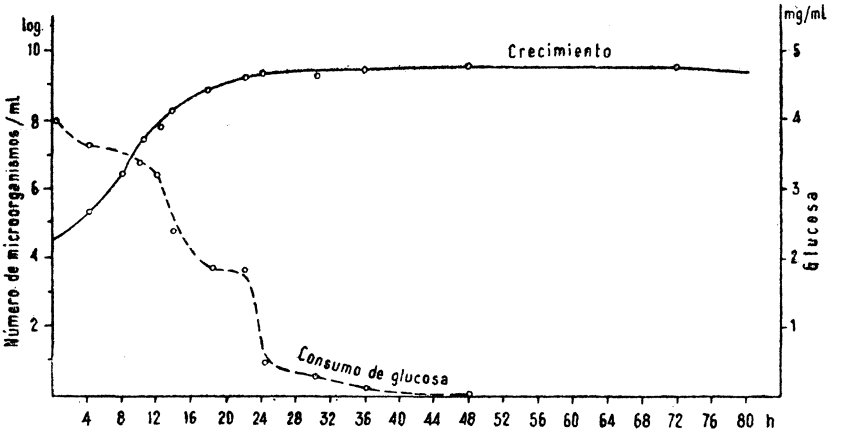


Figura 4. Cultivo 12

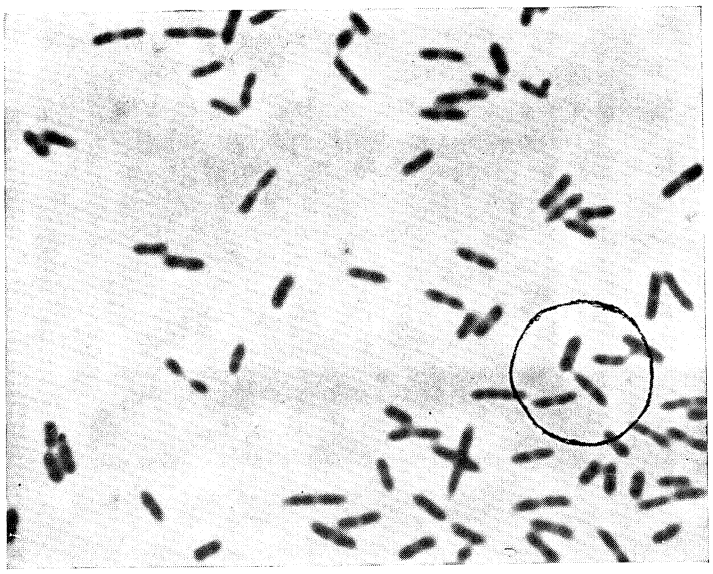


Figura 6. Cultivo 8. Hidrólisis ácida

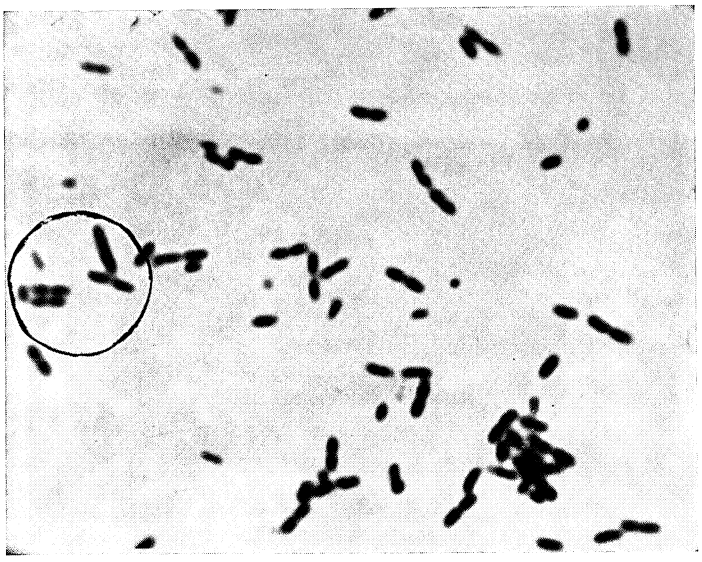


Figura 5. Cultivo 1. Hidrólisis ácida

Figura 8. Cultivo 1. Hidrólisis con ribonucleasa

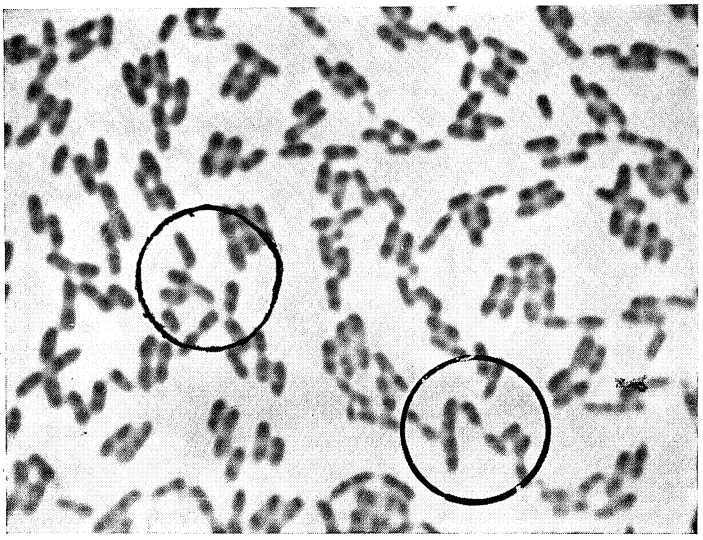


Figura 7. Cultivo 12. Hidrólisis ácida

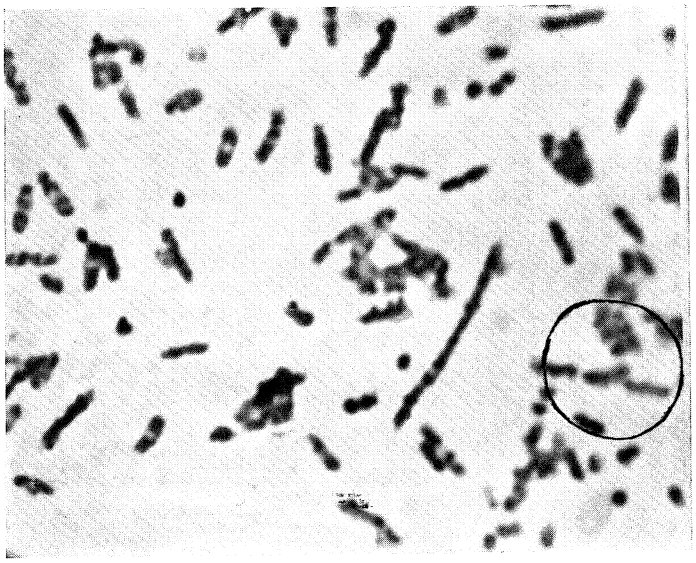


Figura 10. Cultivo 12. Hidrólisis con ribonucleasa

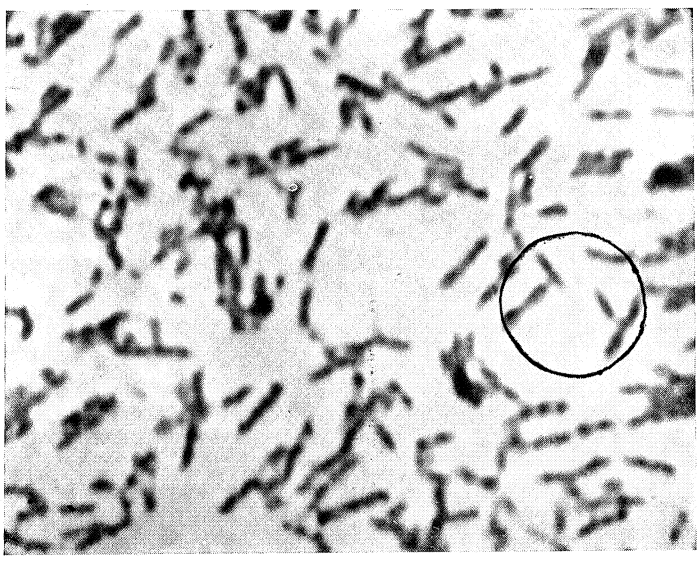


Figura 9. Cultivo 8. Hidrólisis con ribonucleasa

nencial, la duración de las mismas, el número de generaciones y el tiempo de generación, en los cultivos irradiados y en el normal testigo.

Cuadro 1

Cultivo	Duración de la fase exponencial Horas	Número de generaciones	Tiempo de generación Minutos
1	8	13,50	35
8	16	15,25	63
12	13	14,00	55

La fase de disminución del ritmo de crecimiento es también distinta en los tres cultivos; es más brusco el paso a la fase estacionaria en el cultivo 1 (cultivo normal testigo); más gradual y lento en los irradiados, en los que se obtiene un tope mayor en el recuento de microorganismos viables.

Como puede observarse en las *figuras 2-4*, el consumo de glucosa es más gradual y regular en la evolución del cultivo 1. Se observan saltos bruscos en el consumo a las doce y veinticuatro horas de los cultivos, los que, en nuestra experiencia, han resultado perfectamente superponibles en los cultivos irradiados 8 y 12, pero que no corresponden, como sería de esperar, a un aumento proporcional en el número de microorganismos.

Se llega al agotamiento casi total de la glucosa entre las treinta y seis y cuarenta y ocho horas de los cultivos.

Los cultivos se mantuvieron en la fase estacionaria durante los dos meses que duró esta experiencia, pese al consumo de la fuente de carbono del medio. Resulta evidente que los elementos agotados del medio e indispensables para que las células crezcan y se reproduzcan, deben ser suministrados seguramente por moléculas más complejas, que forman parte de las células muertas y que se liberan por desintegración.

Con respecto al estudio citológico, debemos decir que no hemos encontrado diferencias aparentes en el tamaño, en la morfología y en la relación núcleo : protoplasma, entre las células del cultivo testigo, 1, y las irradiadas, 8 y 12, tanto en las tratadas por hidrólisis ácida como en las obtenidas por hidrólisis enzimática.

En todos los preparados nos llama la atención la presencia de células que permanecen unidas por restos de protoplasma, a pesar de que son células con doble núcleo y próximas a dividirse.

La interpretación que podemos dar a este fenómeno es que las células han sido sorprendidas en un momento previo a la división y separación, o bien, siguiendo el pensamiento de Lederberg y de otros investigadores, creemos que las células se presentan unidas como consecuencia de la copulación entre dos células bacterianas.

RESUMEN

Del estudio comparativo simultáneo entre las curvas de crecimiento y de consumo de glucosa del *Aerobacter aerogenes* normal y las del irradiado con radiaciones ultravioletas, con intensidad suficiente como para matar más del 99 por ciento de los microorganismos (40.000 a 50.000 erg. cm^2/s), se demostró una modificación de la curva en el cultivo irradiado, que se traduce fundamentalmente en el alargamiento de la fase exponencial y en un aumento neto del tiempo de generación, que es de treinta y cinco minutos en el cultivo normal y de sesenta y tres minutos en el irradiado ocho veces (sembrados en medio M 9 glucosa).

La fase de disminución del ritmo de crecimiento es más gradual y lenta en los cultivos irradiados, en los que se alcanza un tope mayor en el número de microorganismos.

El consumo de glucosa en los mismos tiempos en que se realizó el recuento de unidades viables para establecer la curva de crecimiento, es más rápido en el cultivo de *Aerobacter* normal no sometido a las radiaciones ultravioletas. En los irradiados se producen saltos bruscos de consumo que no corresponden frecuentemente a un aumento del número de células, y esto ocurre a las doce y veinticuatro horas de cultivo.

El estudio citológico ha demostrado que no existen diferencias aparentes en el tamaño, en la morfología y en la relación núcleo : citoplasma, tanto en las células del cultivo testigo como en las células de los cultivos tratados por radiaciones ultravioletas.

Con relativa frecuencia se observan, según la técnica seguida, células bacterianas unidas por citoplasma, que creemos pueden ser procesos de copulación.

SUMMARY

In the comparative simultaneous studies carried out between the growth curves and the metabolism of glucose of non-irradiated *Aerobacter aerogenes* and the U. V. irradiated *Aerobacter,* it was shown a change in the curve of the irradiated culture: the exponential phase and the time of generation increase in the latter; the generation time is 35 minutes in the non-irradiated cultures and 63 minutes in the cultures irradiated 8 times (inoculated in M 9 glucose medium). The U. V. radiation was of sufficient intensity to kill 99 per cent of the organisms (40,000 to 50,000 erg. cm^2/s).

In the irradiated cultures the decrease in the growth rate is more gradual and slower, and the number of microorganisms reaches a higher degree than in the non-irradiated cultures.

In equal experimental conditions the irradiated *Aerobacter* metabolizes more glucose than the non-irradiated cultures and in an irregular way, specially after 12 and 24 hours incubation, but no increase in the number of cells is observed.

Cytologic study has demonstrated that there are no apparent differences in the size, morphology and nucleus-cytoplasm relation either in the witness-culture cells or the culture cells treated with U. V. radiations.

Besides, certain bacterian cells linked by cytoplasm, wich we believe may be copulation-like process are observed.

BIBLIOGRAFIA

1. Daurat, T. S. de, y Verna, L. C. 1963. Influencia de las radiaciones ultravioletas y de la fotorreactivación en distintas fases del crecimiento del *Aerobacter aerogenes.* Microbiol. Espan., 16, 81-89.
2. Dawes, E. A., y Ribbons, D. W. 1964. Some aspects of the endogenous metabolism of bacteria. Bacteriol. Rev., 28, 126-49.
3. Kelner, A., y Jacobs, L. L. 1959. Ultraviolet-induced abnormal growth in *Escherichia coli;* the influence of yeast extract and the photoreactivation. J. Bacteriol., 77, 281-95.
4. Robinow, C. F. 1942. A study of the nuclear apparatus of bacteria. Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B, 130, 229-324.

5. Robinow, C. F. 1944. Citological observations of the *E. coli, P. vulgaris* and various aerobic spore-forming bacteria with special reference to the nuclear structures. J. Hyg., 43, 413-23.
6. Robinow, C. F. 1949. *En* Dubos, R. J.: The bacterial cell, 460. Harvard Univ. Press, Mass.
7. Somogy, M. 1945. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem., 160, 61-68.
8. Somogy, M. 1945. Determination of blood sugar. J. Biol. Chem., 160, 69-75.
9. Verna, L. C. 1959. Citología de los actinomicetos. Rev. Latinoam. Microbiol., Supl. 4, 25-42.
10. Verna, L. C., y Daurat, T. S. de. 1962. Fotorreactivación bacteriana (*Aerobacter aerogenes*). Microbiol. Españ., 15, 125-38.
11. Tulasne, R., y Vendrely, R. 1947. Demonstration of bacterial nuclei with ribonuclease. Nature, 160, 225.

Depósito legal: M. 702. - 1958

Art. Gráf. REYES.—Jerónima Llorente, 15.—MADRID.