

---

VOLUMEN 19. 1966

JULIO - DICIEMBRE. NUMEROS 3 - 4

# *Microbiología Española*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

## MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

CALLE DE JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 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, «José María Albareda». Madrid). Mensual. Suscripción: España, 430 PTA; extranjero, 540 PTA. Número: España, 40 PTA; extranjero, 50 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, 60 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO «A. J. CAVANILLES» [Anales del Jardín Botánico de Madrid] (Instituto «A. J. de Cavanilles». Madrid). Anual. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 250 PTA. Número: España, 220 PTA; extranjero, 270 PTA.
- ANALES DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES VETERINARIAS (Instituto de Investigaciones Veterinarias. Madrid). Anual. Suscripción: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA. Número: España, 150 PTA; extranjero, 200 PTA.
- ARCHIVOS DEL INSTITUTO DE ACLIMATACION (Instituto de Aclimatación. Almería). Semestral. Suscripción: España, 60 PTA; extranjero, 75 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 PTA.
- ARCHIVOS DE ZOOTECNIA (Departamento de Zootecnia. Córdoba). Trimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 480 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 180 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, 70 PTA. Número: España, 60 PTA; extranjero, 80 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, 150 PTA; extranjero, 210 PTA. Número: España, 45 PTA; extranjero, 60 PTA.
- GENETICA IBERICA (Laboratorio de Citogenética del Instituto «José Celestino Mutis», de Farmacognosia. Madrid). Trimestral. Suscripción: España y Portugal, 100 PTA; países restantes, 160 PTA. Número: España y Portugal, 30 PTA; países restantes, 45 PTA.
- PUBLICACIONES DEL INSTITUTO DE BIOLOGIA APLICADA (Instituto de Biología Aplicada. Barcelona). Cuatrimestral. Suscripción: España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA. Número: España, 75 PTA; extranjero, 100 PTA.



Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector 1.º: Prof. Gerardo Clavero, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Vicedirector 2.º: Dr. Miguel Rubio, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Titulado Superior de 1.ª del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

## INDICE

	Página
<i>Oxytricha matritensis</i> , sp. nov. (Ciliados, Hipotricos), por <i>Palo- ma Ramírez-Montesinos</i> y <i>J. Pérez-Silva</i> ... .. .	193
Propiedades fisiológicas y sensibilidad a los antibióticos, de las razas de estafilococos propagadoras de bacteriófagos, por <i>Carmen Domínguez</i> y <i>B. Regueiro</i> ... .. .	201
Estudio serológico de <i>Escherichia coli</i> productores de infecciones en las vías urinarias, por <i>A. Ramos</i> , <i>J. Ruiz-Merino</i> y <i>V. Callao</i> ... .. .	241
Producción de toxohormona por levadura de panadería, por <i>J. Olivares</i> , <i>V. Callao</i> y <i>E. Montoya</i> ... .. .	249
Killed fowl plague virus vaccine obtained from chick embryo cells, by <i>E. Ronda</i> , <i>A. García-Gancedo</i> , <i>M.ª Luisa Alonso</i> , <i>Pilar Vilas</i> and <i>Lourdes Lucas</i> ... .. .	257
Valoración de neomicina con <i>Bacillus licheniformis</i> , por <i>F. Fernández</i> ... .. .	281
Antibioticorresistencia <i>in vitro</i> de estafilococos tratados por asociaciones de penicilina con neomicina, novobiocina y kanamicina, por <i>M.ª Teresa Pérez-Ureña</i> ... .. .	287
Valoración de la antibioticorresistencia de bacilos gram-negativos sometidos a interacciones antibacterianas de carácter sinérgico, por <i>M.ª Teresa Pérez-Ureña</i> ... .. .	299
Supervivencia e infectividad de distintas estirpes de <i>Rhizobium</i> en distintos tipos de suelo, por <i>Eulalia Cabezas de Herrera</i> .	321
Investigación sobre la frecuencia de anticuerpos neutralizantes frente a poliovirus (Barcelona, 1965), por <i>A. Pumarola</i> y <i>A. Rodríguez-Torres</i> ... .. .	327

---

VOLUMEN 19

1966

# *Microbiología Española*

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



---

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS  
MADRID

Director: Prof. Lorenzo Vilas, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Vicedirector 1.º: Prof. Gerardo Clavero, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Vicedirector 2.º: Dr. Miguel Rubio, Jefe de Sección del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Titulado Superior de 1.ª del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

---

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

**MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA**

CALLE DE JOAQUÍN COSTA, 32 MADRID, 6 (ESPAÑA)

Suscripción (4 números): España, 200 PTA; extranjero, 300 PTA

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA

<i>Ramos, A.; Ruiz-Merino, J., y Callao, V.:</i> Estudio serológico de <i>Escherichia coli</i> productores de infecciones en las vías urinarias ... ..	241
<i>Ramos, A.:</i> véase <i>Callao, V.</i> ... ..	173
<i>Regueiro, B.:</i> véase <i>Domínguez, Carmen</i> ... ..	201
<i>Rodríguez-Rebollo, M.:</i> <i>Salmonella dublin</i> y <i>S. bredeney</i> en colecistos de vacuno de abasto ... ..	183
<i>Rodríguez-Torres, A.:</i> véase <i>Pumarola, A.</i> ... ..	327
<i>Ronda, E.:</i> Actividad del interferón producido por el virus de la seudopeste aviar (NDV) frente a otros mixovirus ... ..	53
<i>Ronda, E.; García-Gancedo, A.; Alonso, M.<sup>a</sup> Luisa; Vilas, Pilar, and Lucas, Lourdes:</i> Killed fowl plague virus vaccine obtained from chick embryo cells ... ..	257
<i>Ross, A. J.:</i> véase <i>Conroy, D. A.</i> ... ..	115
<i>Rubio-Huertos, M., y López-Abella, D.:</i> Ultraestructura de células de pimiento infectadas con un virus y su localización en las mismas ... ..	77
<i>Ruiz-Merino, J.:</i> véase <i>Ramos, A.</i> ... ..	241
<i>Santaolalla, M.:</i> Estudio comparativo del componente graso del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y de sus formas L fijas. II. Variaciones según el medio de cultivo y estudio de los fosfolípidos ... ..	1
<i>Santaolalla, M.:</i> Identificación de esteroides en la grasa neutra del <i>Clostridium tetani</i> y sus formas L fijas ... ..	87
<i>Sedano, A.:</i> véase <i>Callao, V.</i> ... ..	45
<i>Valdez, I. E.:</i> véase <i>Conroy, D. A.</i> ... ..	115
<i>Vilas, Pilar:</i> véase <i>Ronda, E.</i> ... ..	257

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

*OXYTRICHA MATRITENSIS*, SP. NOV.  
(CILIADOS, HIPOTRICOS)

por

PALOMA RAMIREZ-MONTESINOS y J. PEREZ-SILVA

INTRODUCCION

Según datos que se recogen en la obra de Kahl (2), el género *Oxytricha* fue establecido por Bary (1824), admitido por Ehrenberg (1838) y enmendado por Wrzesniowski (1877).

Kahl (2) divide el género en seis subgéneros: *Urosoma*, *Steinia*, *Oxytricha*, *Tachysoma*, *Opistotricha* y *Stylonychia*, y dentro del subgénero *Oxytricha* agrupa dieciocho especies, dando las claves para su identificación.

En la bibliografía posterior a la obra de Kahl hemos encontrado descripciones de nuevas especies y variedades de *Oxytricha*. Margalef (3) establece en 1945 una variedad de *Steinia candens* Kahl, a la que denomina *Oxytricha (Steinia) candens*, variedad *aestuari*. Gelei y Szabados (1) describen en 1953 seis nuevas especies, que son: *O. phytofaga*, *O. bivacuolata*, *O. elliptica*, *O. longa*, *O. plana* y *O. magna*. Por último Seshachar y Kasturi (5) publican en 1963 la descripción de otra especie de *Oxytricha*, sin proponer ninguna denominación para ella.

En el presente trabajo damos las características de una especie perteneciente al subgénero *Oxytricha* hasta ahora no descrita, para la que proponemos el nombre de *O. matritensis*.

## MATERIAL Y METODOS

Esta especie fue aislada por uno de nosotros de una muestra de musgo recogida en enero de 1960, en la fuente que hay en el patio del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid). Desde entonces se viene cultivando en nuestro laboratorio.

Se desarrolla bien en los medios de extracto de suelo, infusión de espinacas e infusión de lechuga.

Para la tinción de núcleos empleamos la reacción nuclear de Feulgen, fijando con líquido de Sanfelice e hidrolizando durante ocho minutos a 60 °C. En algunos casos hemos utilizado también el acetocarmín.

Para poner de manifiesto las organelas superficiales, empleamos el método de coloración ya descrito en un trabajo previo (4).

DESCRIPCION DE *OXYTRICHA MATRITENSIS*, SP. NOV.

Cuerpo deprimido, flexible, de forma elíptica (*figuras 1-2*), ligeramente ensanchado por la parte posterior. La longitud del cuerpo oscila entre 100 y 120  $\mu$ , siendo la relación longitud/anchura de 3:1. Esta

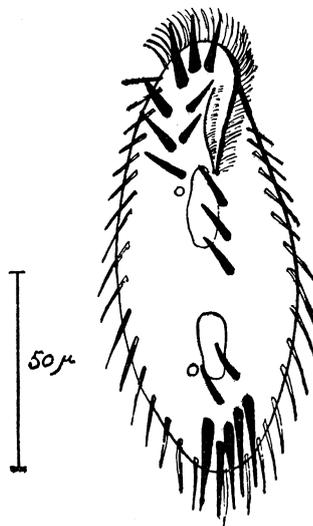
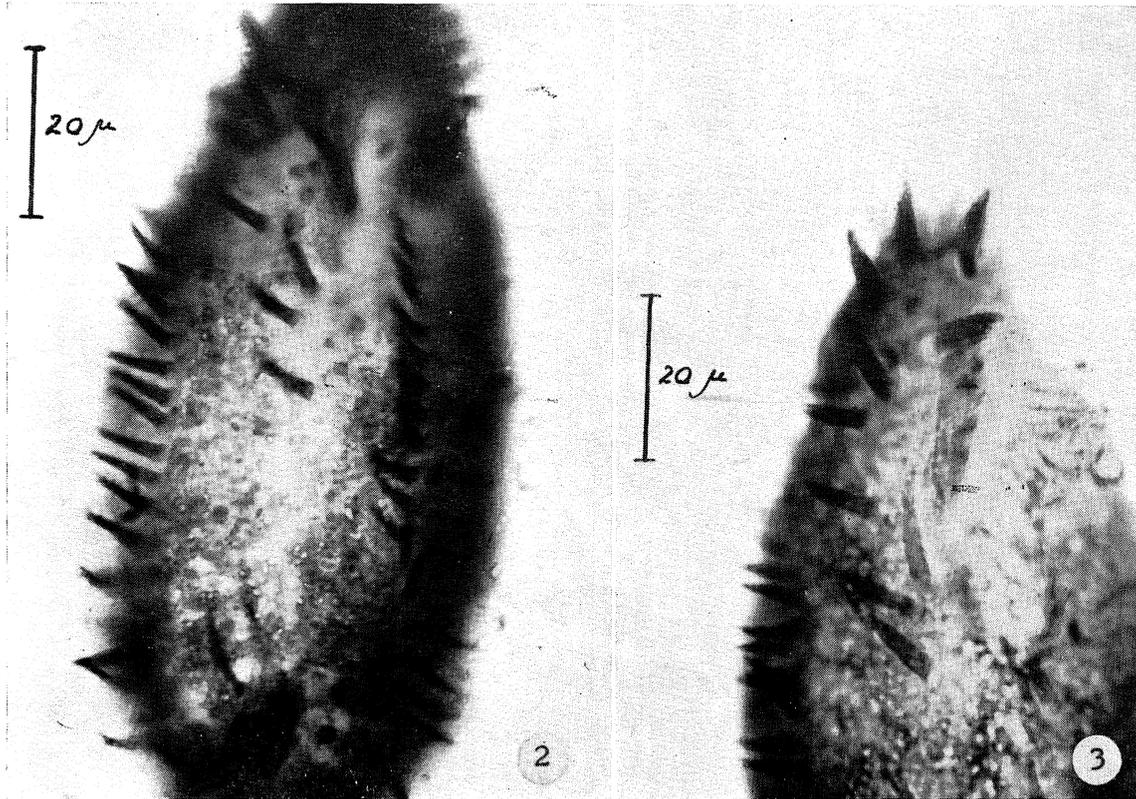
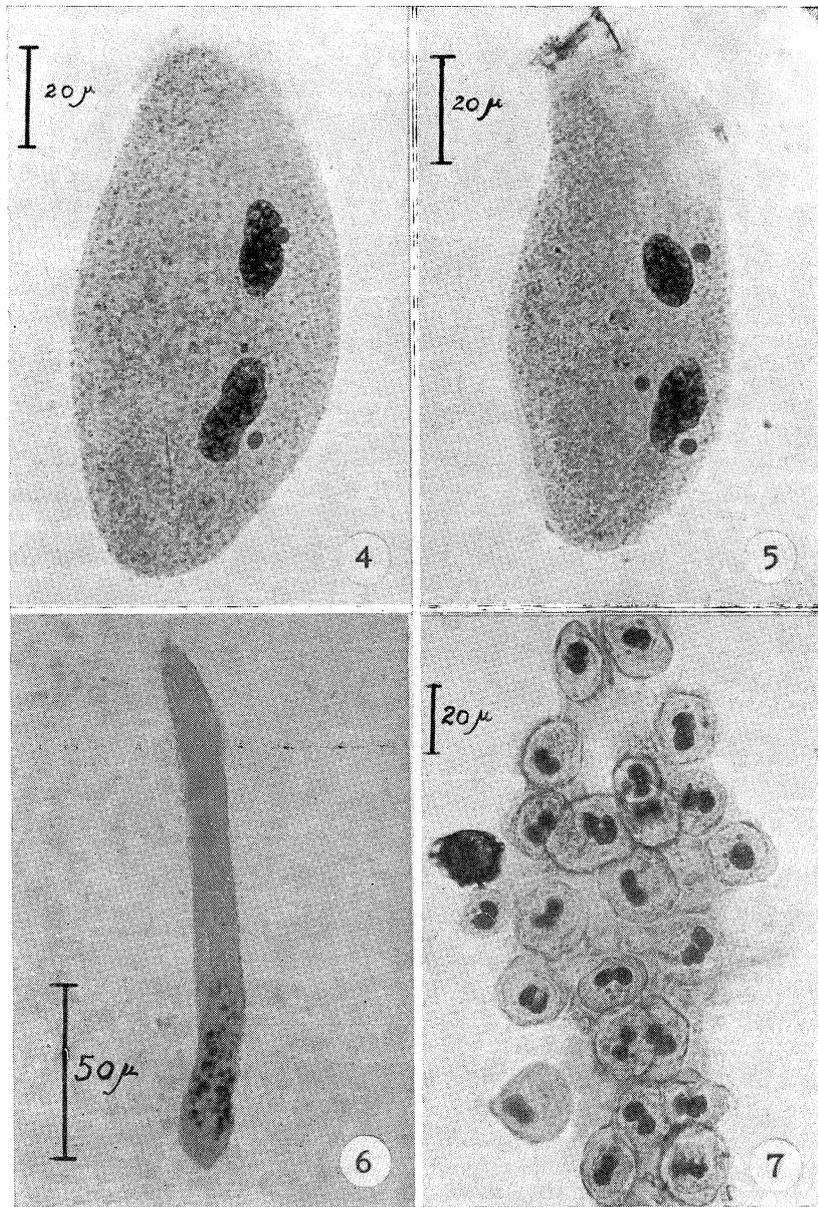


Figura 1. Caracteres morfológicos de *Oxytricha matritensis*



Figuras 2-3. *Oxytricha matritensis*. *Organelas externas*. 2) *Cirros marginales, ventrales y transversales*. 3) *Cirros del campo frontal*



Figuras 4-7. *Oxytricha matritensis*. 4) Individuo con dos fragmentos macronucleares y dos micronúcleos. Acetocarmin. 5) Individuo con dos fragmentos macronucleares y tres micronúcleos. Acetocarmin. 6) Individuo exconjugante poco después de la separación. Reacción nuclear de Feulgen. 7) Quistes. Reacción nuclear de Feulgen

relación llega a alcanzar valores de 10:1 en los individuos exconjugantes, los cuales se alargan y se hacen extraordinariamente flexuosos (*figura 6*).

Los cirros marginales forman dos hileras, que se unen en el extremo posterior del cuerpo (*figura 1*).

En el campo frontal hay ocho cirros (*figuras 1 y 3*); los tres anteriores son mucho más robustos que los restantes; otros tres están alineados formando una hilera corta que desciende oblicuamente hacia la línea media del cuerpo, terminando a la altura del vértice peristomático; los dos cirros restantes se encuentran situados junto a la membrana ondulante.

En la zona ventral (*figuras 1 y 2*) hay cinco cirros; tres de ellos se alinean formando una pequeña hilera que comienza en el vértice del peristoma y termina hacia la mitad del cuerpo. Los dos restantes, más pequeños que los anteriores y muy poco ostensibles, se insertan delante de los cirros transversales.

Existen cinco cirros transversales, que rebasan el borde posterior del cuerpo (*figuras 1 y 2*), casi alcanzando los extremos de los cirros marginales posteriores.

No se observan cirros caudales.

La zona adoral de membranelas mide aproximadamente 1/3 de la longitud total del cuerpo (*figuras 1 y 2*). La membrana ondulante se presenta ligeramente curvada en su extremo anterior, hacia la izquierda, pero sin alcanzar la zona de membranelas.

En la mayoría de los casos, cada individuo posee dos fragmentos macronucleares ovoides o elipsoidales (*figuras 4 y 5*), que miden aproximadamente  $19 \mu$  de eje mayor  $\times 7 \mu$  de eje menor, y dos micronúcleos esféricos, de unas  $3 \mu$  de diámetro. En ocasiones pueden observarse individuos con tres fragmentos macronucleares y tres micronúcleos. Otras veces existen dos fragmentos macronucleares y tres micronúcleos (*figura 5*).

Esta especie forma quistes esféricos, de 24-26  $\mu$  de diámetro y de cubierta lisa (*figura 7*). En estos quistes, el macronúcleo se presenta formando una sola masa, que suele estar dividida en dos o tres lóbulos, y puede haber de uno a tres micronúcleos.

## DISCUSION

La especie que aquí describimos presenta las características del subgénero *Oxytricha* (género *Oxytricha*) de la clasificación de Kahl (2), pero no coincide con ninguna de las especies que figuran en este subgénero ni con las que se han descrito posteriormente (1, 3 y 5).

Por su morfología, tamaño y hábitat nuestra especie se asemeja a *Oxytricha ludibunda* Stokes y a *O. saprobia* Kahl, pero se diferencia de la primera en el número y disposición de los cirros transversales y en el tamaño relativo de los cirros caudales, y de *O. saprobia*, en que no posee sedas dorsales y en el número de micronúcleos.

Asimismo, en su configuración general, *Oxytricha matritensis* es similar a *Opisthotricha (Oxytricha) similis* Engelman, pero se diferencia de ésta precisamente en los caracteres que separan los subgéneros *Oxytricha* y *Opisthotricha*.

## RESUMEN

Se describe la morfología, tamaño, dotación de cirros y configuración de los núcleos de una nueva especie del subgénero *Oxytricha* (género *Oxytricha*), y se compara con *O. ludibunda* Stokes, *O. saprobia* Kahl y *Opisthotricha (Oxytricha) similis* Engelman, que son con las que presenta un mayor parecido.

## SUMMARY

Morphology, size, cirri equipment and nuclear features of a new species of the sub-genus *Oxytricha* (genus *Oxytricha*) are described. The authors indicate similarities and differences between this new species and *O. ludibunda* Stokes, *O. saprobia* Kahl and *Opisthotricha (Oxytricha) similis* Engelman, the three which appear to be the most similar.

## BIBLIOGRAFIA

1. GELEI, J. von, y SZABADOS, M. 1950. Massenproduktion in einer städtischen Regenwasserpflanze. Ann. Biol. Univ. Szeged, 1, 249-94.
2. KAHL, A. 1932. Urtiere oder Protozoa. I: Wimpertiere oder Ciliata (Infusoria). En F. DAHL. Die Tierwelt Deutschlands. Verlag von Gustav Fischer, Jena.
3. MARGALEF, R. 1945. Infusorios de las aguas continentales de la provincia de Barcelona. Bol. Real Soc. Españ. Hist. Nat., 43, 369-81.
4. PÉREZ-SILVA, J., y RAMÍREZ-MONTESINOS, P. 1964. Un método de coloración de las organelas superficiales de los ciliados hipótricos. Microbiol. Españ., 17, 189-94.
5. SESHACHAR, B. R., y KASTURI, A. R. 1963. Cytology of a new species of *Oxytricha*. Arch. Protistenk., 106, 456-64.

C. S. I. C.  
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA  
SECCION DE MICROBIOLOGIA, DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

## PROPIEDADES FISIOLÓGICAS Y SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS DE LAS RAZAS DE ESTAFI- LOCOCOS PROPAGADORAS DE BACTERIOFAGOS

por

CARMEN DOMINGUEZ (\*) y B. REGUEIRO

### INTRODUCCION

La ignorancia del mecanismo de patogenicidad del estafilococo hace que sea difícil y que todavía constituya un problema el control quimioterápico o serológico del mismo. Posiblemente, la causa más importante se encuentra en la enorme capacidad de adaptación de este germen a los factores físicos y químicos que le rodean. Es por esto por lo que el estafilococo evoluciona más rápidamente que otras especies, como puede demostrarse fácilmente con el fenómeno de adquisición de resistencia a los antibióticos (2).

Las razones anteriores justifican el gran número de trabajos que sobre el estafilococo siguen apareciendo en la literatura. Elek (14), Williams (36) y otros muchos autores afirman que continúan siendo de interés todos los estudios orientados a esclarecer algo más la biología del estafilococo.

Las propiedades fisiológicas del estafilococo han sido muy estudiadas, pero todavía no se ha llegado a una conclusión definitiva sobre cuál o cuáles son las causantes de la patogenicidad. Afirma Blair (8) que si se demostrara que alguna de estas propiedades o posibles «fac-

---

(\*) Con ayuda de una beca de la Comisaría de Protección Escolar.

tores de virulencia» toma parte en el establecimiento de la infección sería posible el caracterizar más exactamente al estafilococo patógeno. Numerosos autores han tratado de relacionar las propiedades fisiológicas del estafilococo con su patogenicidad (11, 13, 25, etc.).

Hace algún tiempo que Blair (7) revisó los factores que determinan la patogenicidad del estafilococo; sin embargo, desde que Smith y Halse (28) mostraron la correlación entre producción de coagulasa y patogenicidad, dicha enzima es el criterio más seguido de la presencia del estafilococo patógeno. Bairn-Parker (5) dice que, teniendo en cuenta la gran variación de propiedades fisiológicas que sufre el estafilococo, un solo carácter no puede considerarse como crítico para la determinación de una especie y debe acudir a otros; sin embargo, reconoce que la producción de coagulasa es esencial para reconocer al *Staphylococcus aureus* y diferenciarlo de las otras especies.

Orientados hacia su clasificación, numerosos autores estudian las propiedades fisiológicas de los estafilococos; entre ellos destacan Bairn-Parker (4), Cowan (12), Mossel (21) y Shaw y colaboradores (26). Todas estas propiedades del estafilococo son estudiadas *in vitro*, por lo que lógicamente *in vivo* podrían diferir. Beinning y Kennedy (10) estudian esto en las dos condiciones y observan que estas diferencias son más bien de tipo cuantitativo que cualitativo.

Es difícil el hacer sólo una relación de trabajos realizados sobre todas y cada una de las propiedades del estafilococo y orientadas sobre todo a buscar el origen de su patogenicidad. De todos estos trabajos derivamos la consecuencia de que la producción de coagulasa es la característica fundamental del *Staphylococcus aureus*, que es la especie considerada como patógena. Esta especie comprende varias razas, que se agrupan, sobre todo, según el tipo de bacteriófagos por quien son lisadas.

La técnica de tificación por bacteriófagos fue introducida por Wilson y Atkinson (35) y estandarizada por Blair y Williams (9), siendo técnica de gran interés para el estudio del origen y epidemiología de las infecciones estafilocócicas. Siendo el estafilococo un germen tan sensible y variable, se comprende que en las relaciones de bacteria-bacteriófago, se produzcan fenómenos de lisogenicidad y transducción que hacen variar el tipo de bacteriófago y consiguientemente otras propiedades fisiológicas y bioquímicas.

Es por estas últimas razones por las que se hace necesario el estan-

darizar y controlar las razas de *Staphylococcus aureus* que se emplean en la propagación de bacteriófagos. Este fue el objetivo de Solomon y Sanclemente (29), que estudiaron las propiedades fisiológicas de las razas propagadoras de bacteriófagos. Se concretaron a determinar las propiedades siguientes: coagulasa, proteína exocelular, curva de crecimiento, fosfatasa ácida, tamaño de células, adsorción de oxígeno, sensibilidad a los antibióticos, penicilinas, catalasa, hemolisina, manitol y gelatinasa. Observan que el pigmento varía de blanco a amarillo fuerte, que todas las razas producen coagulasa y fosfatasa y fermentan manitol (menos la 73) y que las resistentes a la penicilina (razas 80, 81, 53, 54 y 77), dan penicilinas.

Cuando apareció el anterior trabajo, nosotros también estudiábamos las razas propagadoras de bacteriófagos, por lo cual ahora tratamos de corroborar los resultados de los autores anteriores, pero al mismo tiempo ampliamos el número de propiedades a estudiar y, sobre todo, determinamos algunas en forma cuantitativa. Al mismo tiempo extendimos el estudio de la sensibilidad a los antibióticos y realizamos pruebas sobre el efecto de otras sustancias. Todas estas propiedades fueron también estudiadas en una raza de *Staphylococcus albus*, que se considera no patógena, con el objeto de derivar algunas conclusiones en relación con la no patogenicidad.

## MATERIALES Y METODOS

Se estudian las propiedades de 23 razas propagadoras de bacteriófagos de *Staphylococcus aureus* (29, 52, 79, 80, 3A, 3B, 3C, 55, 71, 6, 7, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 42D, 81, 187, 10.019, 10.017, 8.353), amablemente enviadas por el Dr. W. T. Parker del «Central Public Health Service» (Londres) y de una raza de *St. albus*, del Instituto «Jaime Ferran» de Microbiología (Madrid). Todas ellas se cultivan en medios como: caldo común, agar + caldo, agua de peptona, caldo tripticasa + soja (BBL) e infusión de cerebro + corazón (Difco).

Por los métodos que se indican, se realizan las pruebas fisiológicas siguientes: fermentación de azúcares, producción de indol y acetoina, reacción del rojo de metilo, utilización de citrato, producción de  $\text{SH}_2$ , fermentación de leche tornasolada, tolerancia al cianuro, producción de amilasa, caseinasa, ureasa, desaminasas y descarboxilasas y reducción

del azul de metileno, por las técnicas de Vaamonde y Regueiro (33).

Crecimiento en agar+telurito+glicina, por la técnica de Beinning y Kennedy (10). Reducción de nitrato, hidrólisis de esculina e hipurato y producción de lecitinasa, por las técnicas de Solomon y Sanclemente (29), así como las determinaciones de producción de catalasa y coagulasa (nosotros empleamos en este caso plasma de caballo).

La gelatinasa se determina por el método de Richov y colaboradores (24), la fosfatasa por la técnica de Barnes y Morris (3), la penicilinasa por el método de Ghos y Borkar (16), la oxidasa por la técnica de Steel (30), la citocromooxidasa por el método de Gaby y Free (15), la desoxirribonucleasa por la técnica de Stone y Burton (31), la deshidrogenasa por el método de Ralston y Baer (22) y la pirofosfatasa por la técnica de Levinson y colaboradores (19) modificada.

Las pruebas de inhibición cruzada se realizan por el método de Barrow (6). Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos se realizan por difusión en placa por medio de los multidiscos (20). Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos por dilución en tubo, se realizan por los métodos dados por Kavanagh (17).

## EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

### 1) *Morfología*

Los estafilococos son cultivados en caldo de tripticasa+soja (BBL), a 37 °C y durante dieciséis horas. Se preparan extensiones que se colorean por el método de Gram y observan al microscopio ordinario ( $\times 1.000$ ). Todas las razas presentan parecidas características de forma y agrupación. Su diámetro es aproximadamente de  $1\mu$  en todos los casos.

Observaciones realizadas al microscopio electrónico en el Servicio de Microscopía Electrónica, de la División de Ciencias del C. S. I. C. ( $\times 8.000$ ), en una serie representativa de razas, no permiten diferenciar características especiales de morfología, en tamaño o agrupación.

### 2) *Propiedades fisiológicas (cualitativas)*

Las técnicas empleadas en estas determinaciones se relacionan en la parte de métodos y materiales y los resultados se expresan en los cuadros 1-6.

Cuadro 1. Fermentación de azúcares

Azúcares	Razas																								
	29	52	79	80	3A	3B	3C	55	71	6	7	42E	47	53	54	75	77	42	81	187	10.019	10.017	8.353	<i>Sf. albus</i>	
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Levulosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arabinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcita	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inositol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ramnosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xilosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Celobiosa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Inulina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

a) *Fermentación de azúcares (cuadro 1)*

En ninguno de los casos se produce gas; pero en cambio, por la producción de ácido, a partir de los azúcares, podemos establecer una división.

Todas las razas fermentan glucosa, levulosa, sacarosa, manitol, maltosa y lactosa (ésta no es fermentada por las razas 10.019 y 8.353). Ninguna raza fermenta arabinosa, dulcita, inositol, rammosa, sorbosa, xilosa, rafinosa, dextrina, celobiosa e inulina.

Se hace una prueba de fermentación de glucosa y manitol en condiciones de anaerobiosis. La glucosa es fermentada en todos los casos. El manitol es fermentado también en todos los casos, pero débilmente en las razas 55, 42E, 75, 8.353 y *Staphylococcus albus*.

b) *Producción de enzimas hidrolíticas (cuadro 2)*

Todas las razas de *Staphylococcus aureus* propagadoras de bacteriófagos son productoras de lecitinasa, caseinasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa que, por el contrario, no son producidas por el *St. albus*. Todas las razas son amilasonegativas.

En relación con la producción de ureasa, fibrinolisisina y penicilinas, los resultados son variables. Todas las razas producen enzimas, excepto las 79, 55, 47, 53, 187 y 8.353, en el caso de la ureasa; las 29, 80, 3B, 7, 47, 42D y *Staphylococcus albus*, en el caso de la fibrinolisisina; las razas 3B, 3C, 6, 7 y 8.353, en el caso de la penicilinas, donde las más activas son las 80, 54 y 47.

c) *Producción de desaminasas y descarboxilasas (cuadro 3)*

Ninguna raza de las estudiadas produce desaminasas para fenilalanina y triptofano. En relación con la producción de descarboxilasas, los resultados obtenidos sobre once aminoácidos son muy variables y no se pueden derivar conclusiones. Dan positivo a todos los aminoácidos las razas 6, 42E, 47, 53, 54, 75, 77, 187, 10.019, 10.017 y *Staphylococcus albus*, en su mayor parte pertenecientes al grupo serológico III (únicamente la raza 7, es negativa a la fenilalanina). Son positivas a todos los aminoácidos, excepto dos, las razas 3A, 3C y 71. Son positivas a todos menos a tres, las razas 79, 80, 42D y 81. Son positivas a todos los



Cuadro 3. Producción de descarboxilasas y desaminasas

Aminoácidos	Razas																								
	29	52	79	80	8A	8B	8C	55	71	6	7	42E	47	53	54	75	77	42D	81	187	10.019	10.017	8.353	St. albus	
Valina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Alanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Aspártico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Isoleucina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Metionina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glicina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glutámico	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lisina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fenilalanina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Triptofano	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

aminoácidos, menos a cuatro, la raza 29; menos a cinco, la 55; menos a seis, la 3B; menos a siete, la 8.353, y menos a ocho, la 52.

d) *Pruebas de crecimiento (cuadro 4)*

Ninguna de las razas de estafilococos crecen en presencia de esculina y cianuro; en cambio, todas crecen en presencia de hipurato. Con relación al crecimiento en medio de citrato de Koser, los resultados son muy variables; todas las razas crecen, a excepción de las 29, 79, 3A, 3B, 3C, 6, 7, 77, 10.019 y 8.353. En presencia de un 10 por ciento de cloruro sódico, crecen todas las razas a excepción de las 29 y 8.353. En presencia de cloruro mercúrico, crecen también todas las razas, a excepción de las 52, 80, 3B, 71, 6, 7, 42E, 42D, 10.017 y 8.353.

Se realiza una experiencia de crecimiento en medio de agar+telurito+glicina, en diferentes condiciones. En aerobiosis, a pH 5,0, no crece ninguna de las razas. A pH 6, 3 hay crecimiento abundante (excepto las razas 80, 55, 42D y 8.353). A pH 7, 2, el crecimiento es más abundante (excepto las razas 80 y 42D). A pH 9, 6, el crecimiento es escaso (no crecen las razas 29, 80, 3A, 3B, 55, 6, 7, 53, 77, 42D, 8.353 y *Staphylococcus albus*). En condiciones de anaerobiosis y a pH 6, 3, el crecimiento es más débil que en aerobiosis, creciendo todas las razas (excepto las 80, 42D y *Staphylococcus albus*).

e) *Producción de enzimas respiratorias (cuadro 5)*

Todas las razas de estafilococos probadas son oxidasonegativas; por el contrario, todas producen catalasa y citocromooxidasa. Todas las razas de *Staphylococcus aureus* propagadoras de bacteriófagos, producen deshidrogenasa y reducen el azul de metileno; por el contrario, el *St. albus* es negativo a estas dos reacciones.

f) *Otras propiedades fisiológicas (cuadro 6)*

Todas las razas de estafilococos probadas no dan indol ni producen SH<sub>2</sub>. A excepción de las razas 52 y 3B, todas las demás producen acetoina. La respuesta a la reacción del rojo de metilo es muy variable; todas son positivas, a excepción de las razas 3B, 3C, 55, 7, 53 y 77.

A excepción del *Staphylococcus albus*, todas las razas de *St. aureus*, producen coagulasa, reducen los nitratos y fermentan la leche tornasolada (bien por reducción, peptonización o coagulación).

Cuadro 4. Pruebas de crecimiento

En presencia de	Razas																							
	29	52	79	80	3A	3B	3C	55	71	6	7	42E	47	53	54	75	77	42D	81	187	10.019	10.017	8.353	<i>St. albus</i>
Citrato	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+
Cianuro	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hipurato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ClNa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cl <sub>2</sub> Hg	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+
Agar + telurito + glicina a pH	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6,3	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	7,2	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
	9,6	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-
	6,3 (*)	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-

(\*) En anaerobiosis; las otras, en aerobiosis.

Cuadro 5. Producción de enzimas respiratorias

Enzimas y azul de metileno	Razas																							
	29	52	79	80	3A	3B	3C	55	71	6	7	42E	47	53	54	75	77	42D	81	187	10.019	10.017	8.353	<i>St. albus</i>
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Citocromooxidasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Deshidrogenasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reducción de azul de metileno	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

Cuadro 6. Otras propiedades fisiológicas

Propiedades	Razas																								
	29	52	79	80	3A	3B	3C	55	71	6	7	42E	47	53	54	75	77	42D	81	187	10.019	10.017	8.353	<i>St. albus</i>	
Coagulasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Nitratos	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Leche tornasolada	R	R	R	R	RC	R	RP	R	R	R	R	R	R	RP	R	RP	RP	R	R	R	R	R	R	—	
Indol	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
SH <sub>2</sub>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
Acetoína	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Rojo de metilo	+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	

R = reducción. P = peptonización. C = coagulación.

3) Propiedades fisiológicas (cuantitativas)

a) Cinética de crecimiento

En todos los casos se emplea el medio de caldo de tripticasa+soja (BBL). El crecimiento en reposo se hace a 37 °C, en baño de agua. A 19 ml de medio se inocula 1 ml de un cultivo de veinticuatro horas, con extinción de 0,044; se mezcla bien y se reparte en tres tubos, cuya extinción se determina a intervalos de tiempo en un fotocolorímetro de Kipp (filtro 53). Se expresa el resultado en el promedio de las tres lecturas. El crecimiento en agitación se realiza en un agitador recíproco (90 impulsos/min y 10 cm de recorrido). En matraz de 500 ml se ponen 95 ml de medio y se inoculan 5 ml de cultivo de veinticuatro horas, de extinción de 0,044; mezcla bien y a intervalos de tiempo se toman muestras (se hace por triplicado) y se determinan extinciones, como en el caso anterior. Los resultados son el promedio de las tres lecturas.

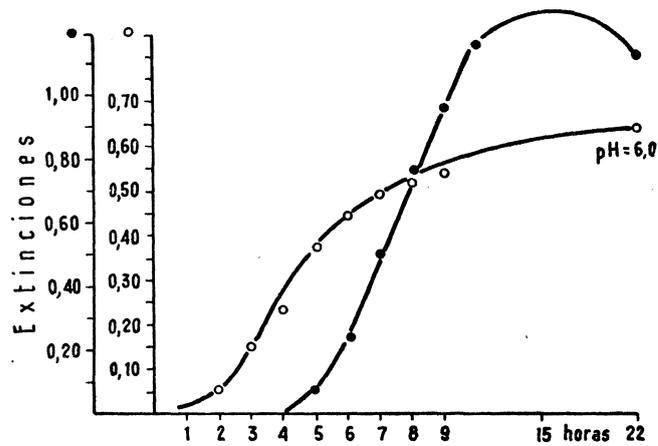


Figura 1

Los resultados se expresan en las figuras 1-4. Damos por separado los resultados de crecimiento en reposo (—O—O—) y crecimiento en agitación (—●—●—).

En *reposito*, el crecimiento comienza entre una-dos horas y llega al máximo a las nueve horas en las razas 29, 79, 3A, 55, 47, 42D y 77 (*figura 1*). Hay crecimiento máximo a las quince horas y más abun-

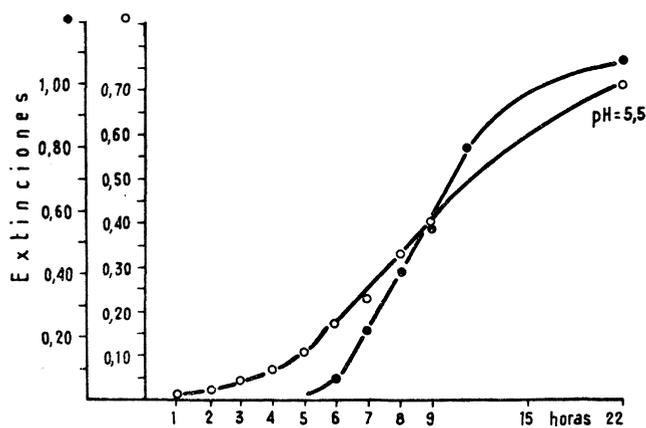


Figura 2

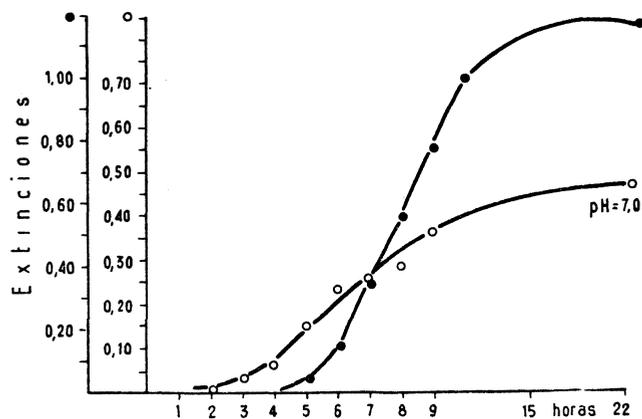


Figura 3

dante en las razas 52, 3B, 3C, 71, 7, 42E, 53, 54, 75, 81, 187, 10.019, 10.017 y 8.353 (*figura 2*). La raza 80 (*figura 3*) da crecimiento máximo a las veintidós horas y menos abundante que las anteriores. Comienza el crecimiento a las cinco horas y es máximo y escaso a las veintidós

horas, en la raza de *Staphylococcus albus* (figura 4). El pH final está en todos los casos entre 5,2 y 6,0; llegando a pH 6,5, en las razas 42D, 52, 3B y 3C; y a pH 7,0, en la raza 80.

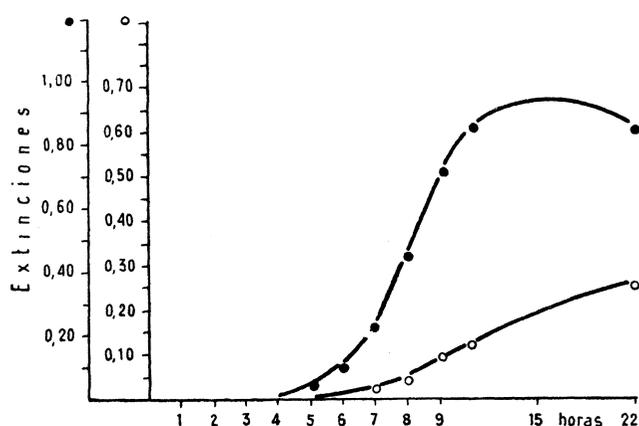


Figura 4

En *agitación*, se observan algunas correlaciones en cuanto al crecimiento máximo y a la velocidad del mismo. En general, este crecimiento es más homogéneo en todos los casos y se inicia a las tres-cuatro horas, llegando al máximo a las quince horas. Crecen más lento que lo normal las razas 3B, 42D, 55, 3C, 52 y 8.353. Más lentas son las razas 7 (la fase logarítmica empieza a las ocho horas), la 6 (la fase logarítmica empieza a las diez horas) y la 3A (la fase logarítmica empieza a las quince horas). El *Staphylococcus albus* inicia su crecimiento a las seis horas y el máximo es menor que en las razas de *St. aureus*.

## b) Producción de fosfatasa (figura 5)

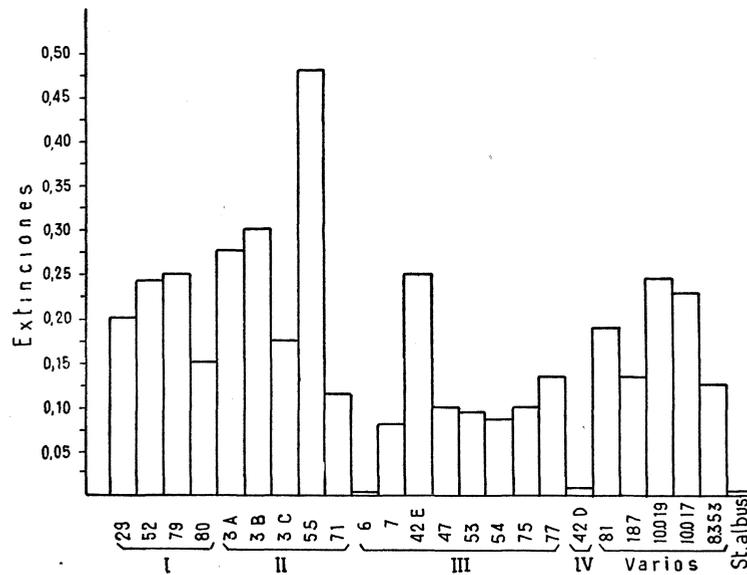


Figura 5

La raza de *Staphylococcus albus* no produce fosfatasa; en cambio, las de *St. aureus*, la dan en más o menos cantidad. Las menos productoras son las razas 6 y 42D y la más productora, con gran diferencia, es la raza 55. La producción de fosfatasa ácida exocelular en las otras razas está entre dichos límites.

c) Producción de pirofosfatasa (figura 6)

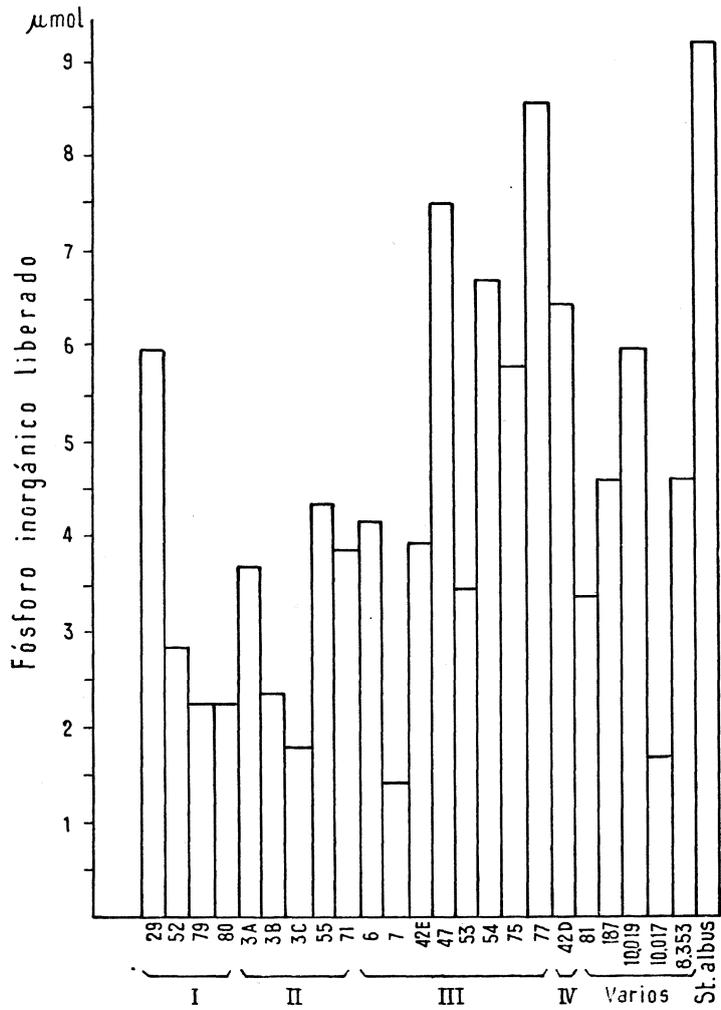


Figura 6

La raza de *Staphylococcus albus* produce pirofosfatasa celular en mucha mayor cantidad que las razas de *St. aureus*, de las cuales las más productoras son las 77, 47, 54 y 42D, y las menos productoras son las razas 7, 10.017 y 3C.

## d) Producción de desoxirribonucleasa (figura 7)

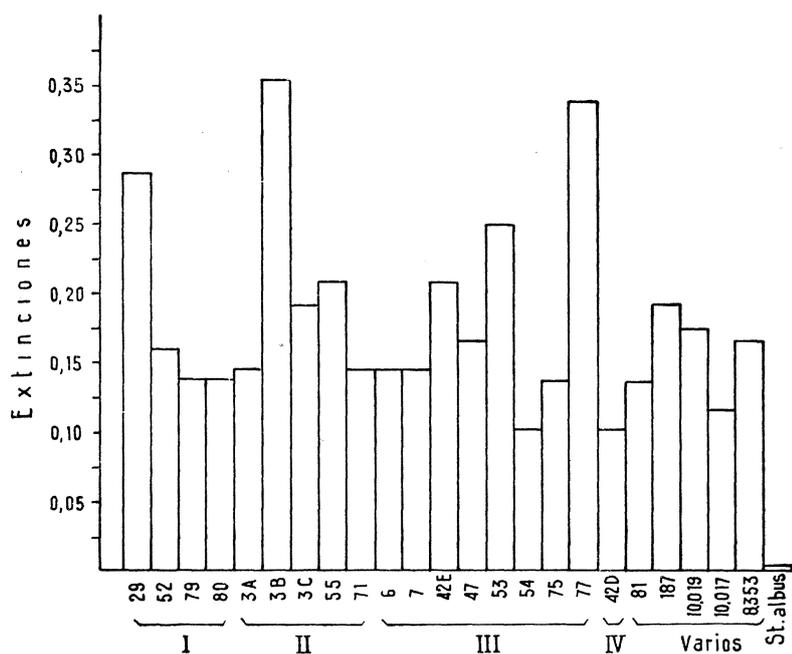


Figura 7

La raza de *Staphylococcus albus* no produce desoxirribonucleasa exocelular; en cambio, las razas de *St. aureus* la dan en más o menos cantidad. Las razas más productoras son las 3B, 77, 29 y 53. Todas las demás dan cantidades aproximadas.

e) Producción de deshidrogenasa (figura 8)

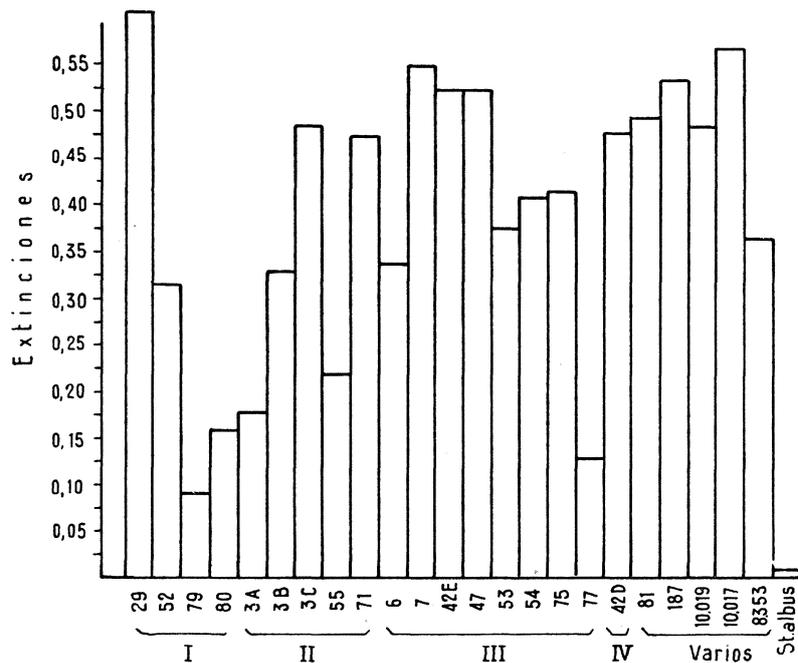


Figura 8

La raza de *Staphylococcus albus* no produce deshidrogenasa celular; en cambio, las razas de *St. aureus* la dan en más o menos cantidad. Las más productoras son las razas: 29, 10.017 y 7, siendo las menos productoras las 79, 77, 80, 3A y 55.

## f) Producción de catalasa (cuadro 7)

Se determina por el método del catalasímetro y se observa que la cantidad de oxígeno desprendido se encuentra en casi todos los casos, entre 1,00 y 2,00; dando menos la raza 187 y más las razas 80, 7, 42E, 42D y 81, pero sin pasar de 2,30. La raza de *Staphylococcus albus* llega a producir 3,90, es decir, doble que el promedio de las otras razas.

Cuadro 7

Raza	Catalasa Mililitros de oxígeno	Gelati- nasa Mililitros activos	Coagulosa y fibrinolisisina Horas				Citrato Porcentajes a pH			
			4	6	48	96	5	6	7	8
29	1,40	1,0	1:160	1:160	1:160	1:400	1,0	2,5	7,5	2,5
52	1,75	0,2	1:200	1:320	1:400	1:200	1,0	2,5	5,0	2,5
79	1,55	1,0	1:128	1:256	1:800	1:400	1,0	2,5	5,0	5,0
80	2,20		1:200	1:160	1:800	1:400	1,0	2,5	7,5	2,5
3A	1,90	0,1	1:256	1:512	1:400	1:200	2,5	2,5	5,0	2,5
3B	1,60		1:320	1:640	1:256	1:256	2,5	7,5	10,0	10,0
3C	1,45		1:320	1:512	1:160	1:400	2,5	7,5	10,0	10,0
55	1,35		1:800	1:320	1:400	1:200	2,5	2,5	5,0	2,5
71	1,40		1:160	1:128	1:160	1:200	2,5	7,5	5,0	5,0
6	1,70		1:640	1:640	1:800	1:400	1,0	2,5	5,0	5,0
7	2,20		1:640	1:256	1:512	1:512	1,0	2,5	5,0	5,0
42E	2,25		1:256	1:512	1:320	1:400	2,5	7,5	7,5	5,0
47	1,80		1:256	1:256	1:640	1:320	1,0	2,5	5,0	5,0
53	1,45		1:256	1:256	1:800	1:400	1,0	2,5	5,0	2,5
54	1,50		1:512	1:512	1:128	1:640	2,5	2,5	5,0	5,0
75	1,00		1:320	1:128	1:800	1:400	2,5	2,5	5,0	5,0
77	1,10		1:256	1:512	1:800	1:200	1,0	2,5	5,0	5,0
42D	2,30		1:160	1:640	1:400	1:200	1,0	2,5	7,5	7,5
81	2,10		1:128	1:256	1:400	1:400	5,0	7,5	10,0	10,0
187	0,80		1:800	1:128	1:400	1:200	5,0	7,5	10,0	7,5
10.019	1,60		1:256	1:512	1:400	1:200	2,5	7,5	5,0	5,0
10.017	1,90		1:640	1:512	1:800	1:400	2,5	5,0	5,0	5,0
8.353	1,60		1:128	1:128	1:400	1:400	1,0	7,5	7,5	5,0
<i>St. albus</i>	3,90						5,0	7,5	7,5	5,0

g) *Producción de gelatinasa (cuadro 7)*

Por el método por el cual determinamos nosotros la actividad gelatinásica de los filtrados de los cultivos de estafilococos, sólo obtenemos actividad en las razas 29, 79, 52 y 3A; encontrándose que la máxima producción ocurre hacia las veinticuatro horas, cuando es también el máximo de crecimiento.

h) *Producción de coagulasa y fibrinolisina (cuadro 7)*

Se estudian estas dos enzimas conjuntamente. La coagulasa coagula el plasma, que después es disuelto por la fibrinolisina. En general, a las seis horas se manifiesta la actividad coagulásica y a las cuarenta y ocho horas se puede demostrar la actividad fibrinolínica. Los resultados se expresan en dilución activa de filtrados de los cultivos.

Las razas más productoras de coagulasa son 3A, 3C, 42E, 54, 77, 10.019 y 10.017; las menos productoras son 29, 80, 52 y 55.

Las razas más productoras de fibrinolisina son 3A, 77, 10.019, 10.017, 79, 3C, 42E, 53 y 81; las menos productoras son 29 y 80, no produciendo esta enzima las razas 3B y 7.

i) *Crecimiento en citrato (cuadro 7)*

Se siembran las razas que se estudian en placas de agar+tripticosa+soja, que contienen diferentes concentraciones de citrato sódico (1,0 a 10,0 por ciento) a los diferentes pH que se indican. El inóculo es una gota de suspensión de cada raza. Las placas se incuban a 37 °C y a las cuarenta y ocho horas se observa el crecimiento.

A pH 5,0 y a excepción de las razas 81, 187 y *Staphylococcus albus*, todas las otras razas son inhibidas con un 5,0 por ciento de citrato. A pH 6,0, todas las razas se inhiben con un 10,0 por ciento de citrato. A pH 7,0, todas las razas crecen en presencia de un 5,0 por ciento de citrato y las razas 3B, 3C, 81 y 187 con un 10,0 por ciento. Por último, a pH 8,0, crecen todas en presencia de un 2,5 por ciento de citrato y continúan resistiendo un 10,0 por ciento las razas 3B, 3C y 81.

## j) Crecimiento en cloruro sódico (figura 9)

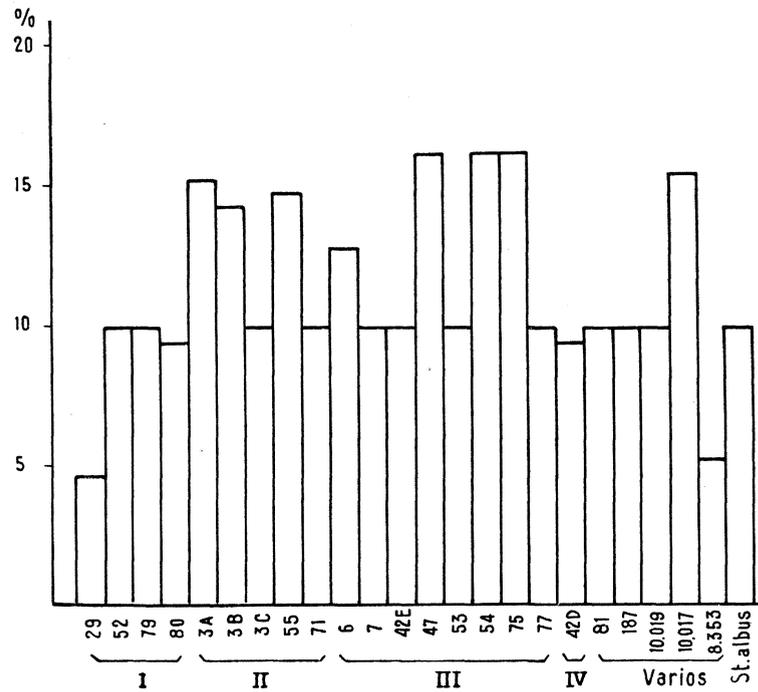


Figura 9

Se realiza la experiencia en las condiciones de la anterior, pero empleando varias concentraciones de cloruro sódico. Todas las razas crecen en presencia de un 5,0 por ciento de cloruro sódico (excepto la 29 y 8.353). Resisten más de un 10 por ciento, las razas 3A, 3B, 55, 6, 47, 54, 75 y 10.017. Resisten más de un 15 por ciento, pero sin llegar al 17 por ciento, las razas 3A, 47, 54, 75 y 10.017.

k) Crecimiento en cloruro mercúrico (figura 10)

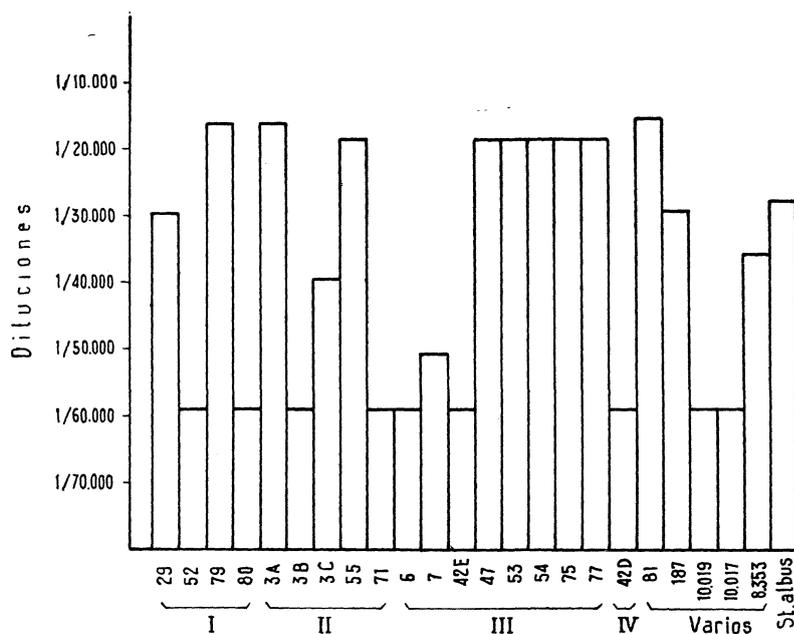


Figura 10

Se realiza la experiencia en las condiciones anteriores, pero empleando diluciones de cloruro mercúrico que se indican. Todas las razas resisten un 1/60.000 de cloruro mercúrico; resisten un 1/30.000, las razas 79, 3A, 55, 47, 53, 54, 75, 77 y 81. Resisten 1/18.000, pero no más, las razas 79, 3A y 81.

l) Crecimiento en laurilsulfato

Esta sustancia, en cantidad de 1,0 mg/ml, inhibe todos los estafilococos, no influyendo la temperatura entre 25° y 45 °C, ni el pH entre 5,0 y 9,0.

#### 4) Pruebas de sensibilidad a los antibióticos

##### a) Pruebas de inhibición cruzada

Realizamos estas pruebas por los métodos que se mencionan en la parte correspondiente y en ninguno de los casos de las razas de *Staphylococcus aureus* y *St. albus* con que trabajamos, se observa la más mínima inhibición cruzada.

##### b) Pruebas de inhibición por dilución

Se sigue el método antes mencionado, con los siguientes antibióticos: bencilpenicilina, ácido 6-aminopenicilánico, dimetoxifenilpenicilina, alfa-aminobencilpenicilina, estreptomycin, tetraciclina, isonicotilmetiltetraciclina y kanamicina. Los resultados se expresan por separado para cada uno (figuras 11-19), observándose que en general y en todas las razas, hay un mayor o menor grado de sensibilidad hacia todos los antibióticos mencionados.

En relación con la *bencil-penicilina*, son sensibles a 0,0001-0,1  $\gamma$ /ml, las razas 3A, 6, 8.353, 3B, 71, 42D, 10.019, 3C, 52, 79, 29, 7 y 42E. Las otras razas necesitan ya más de 40  $\gamma$ /ml, llegando a 50.000-100.000  $\gamma$ /ml las razas 55, 80, 47, 54, 75, 77 y 81, que, por lo tanto, son las que presentan mayor resistencia.

Todas las razas probadas son muy parecidas en su sensibilidad hacia el *ácido 6-aminopenicilánico*, estando entre 0,5-5  $\gamma$ /ml las razas 6, 3A y 8.353; el resto son sensibles a 25-70  $\gamma$ /ml, pasando de esta cantidad las razas 81, 54, 47, 75, 77 y 187; la primera resiste hasta 10.000  $\gamma$ /ml

La sensibilidad hacia la *dimetoxifenilpenicilina*, es aún más homogénea, pues casi todas las razas tienen una sensibilidad entre 0,01-1  $\gamma$ /ml, llegando a 5  $\gamma$ /ml las razas 77 y *Staphylococcus albus*.

En relación con la *alfa-aminobencilpenicilina*, las sensibilidades son muy variables. Están entre 0,0001-0,1  $\gamma$ /ml todas las razas, a excepción de 55, 47, 53, 54, 75, 77, 81, 187 y 10.017, que necesitan entre 500-1.000  $\gamma$ /ml.

Aparte de la penicilina y derivados, vistos anteriormente, se han estudiado las sensibilidades a otros antibióticos, como son los que se citan seguidamente.

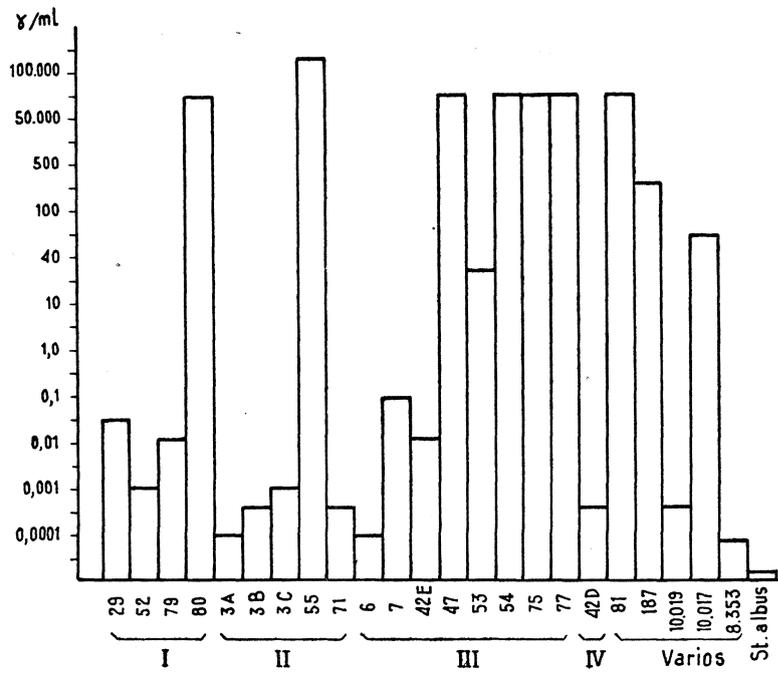


Figura 11

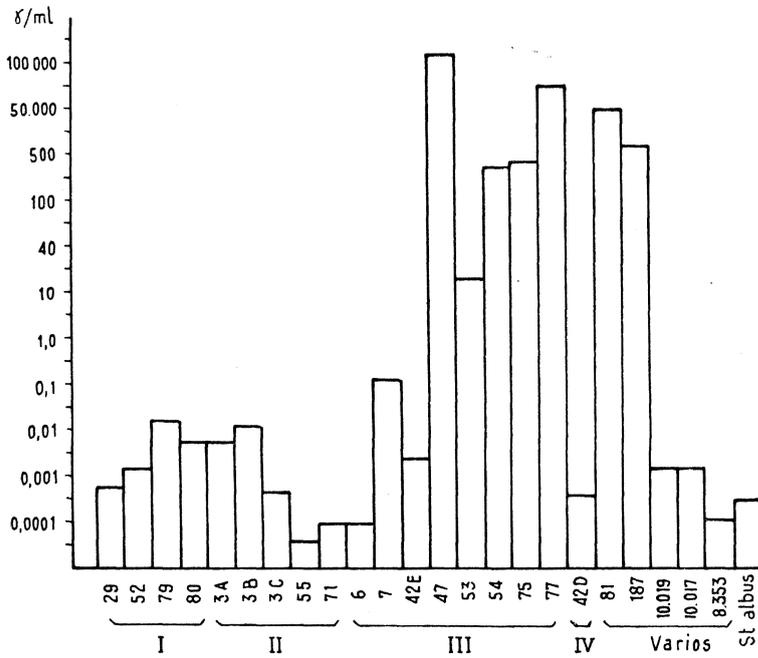


Figura 12

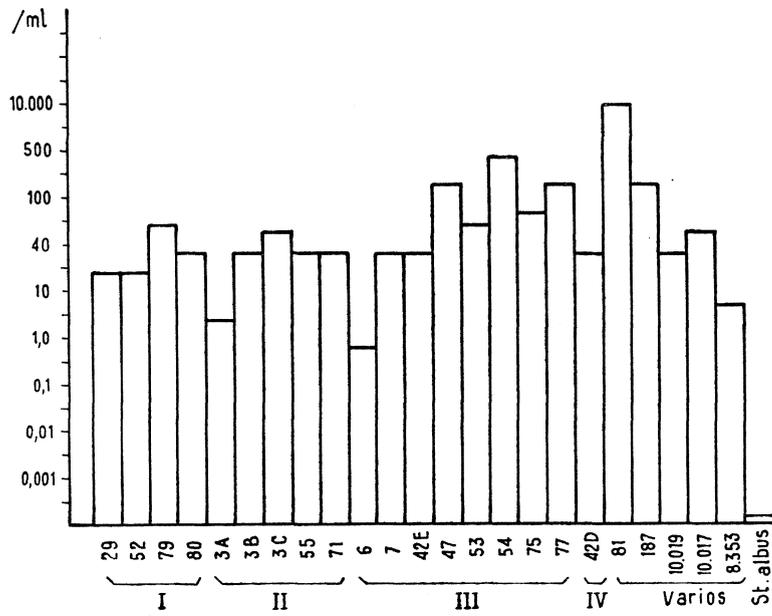


Figura 13

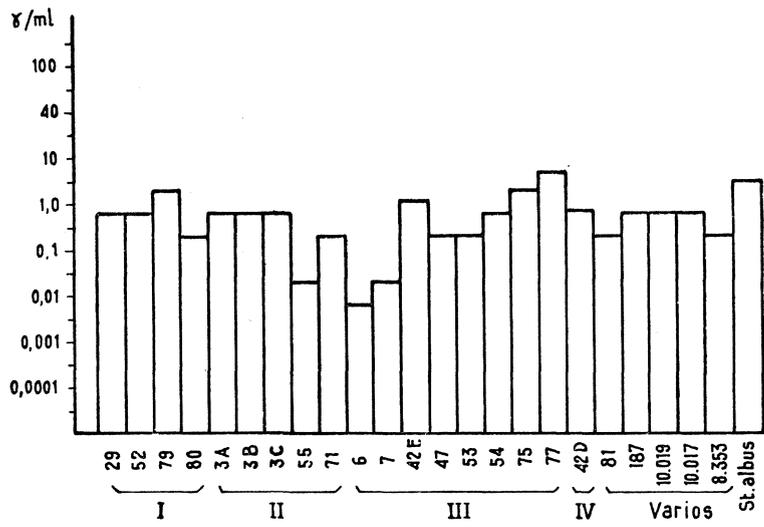


Figura 14

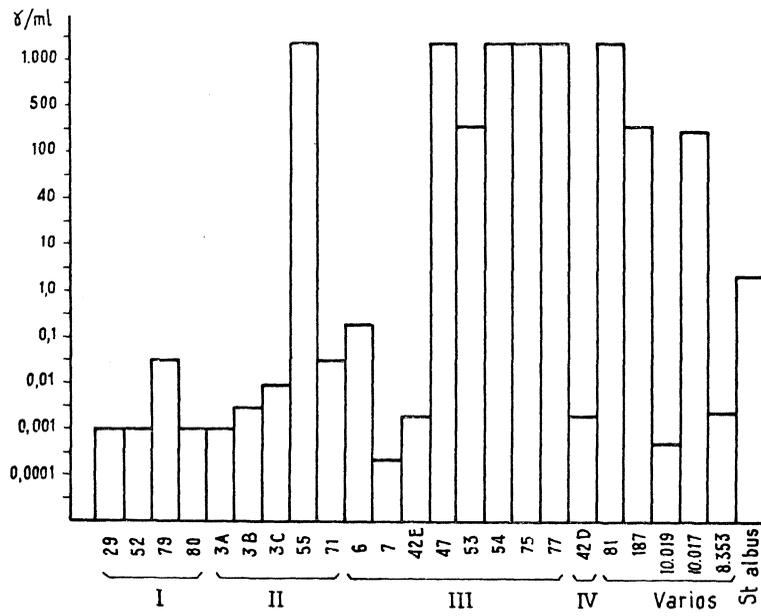


Figura 15

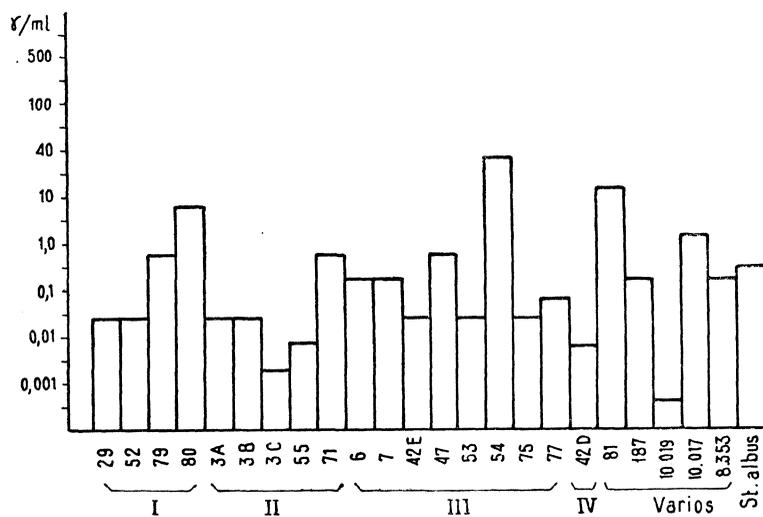


Figura 16

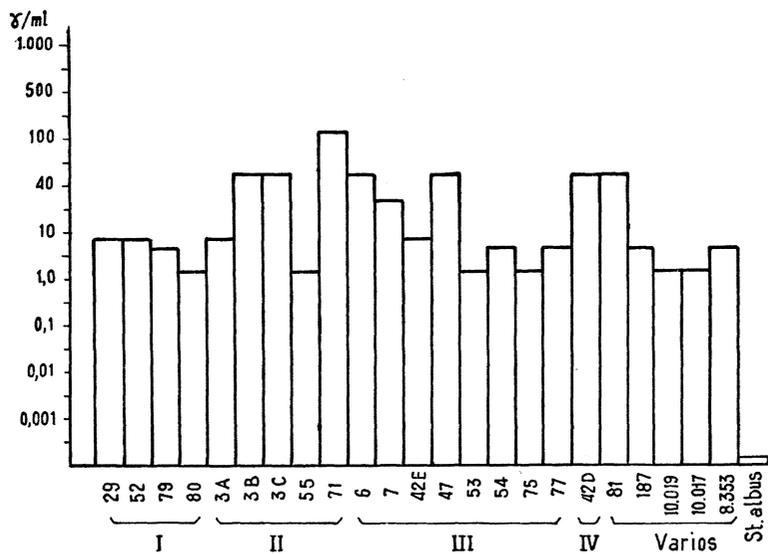


Figura 17

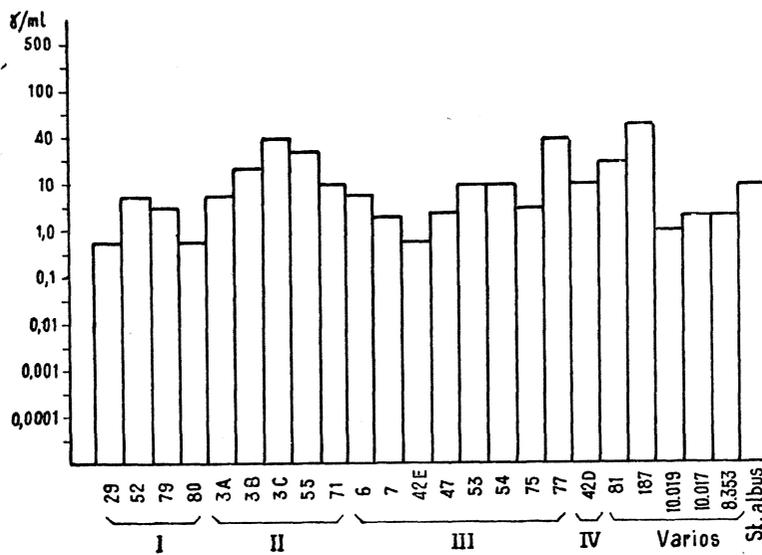


Figura 18

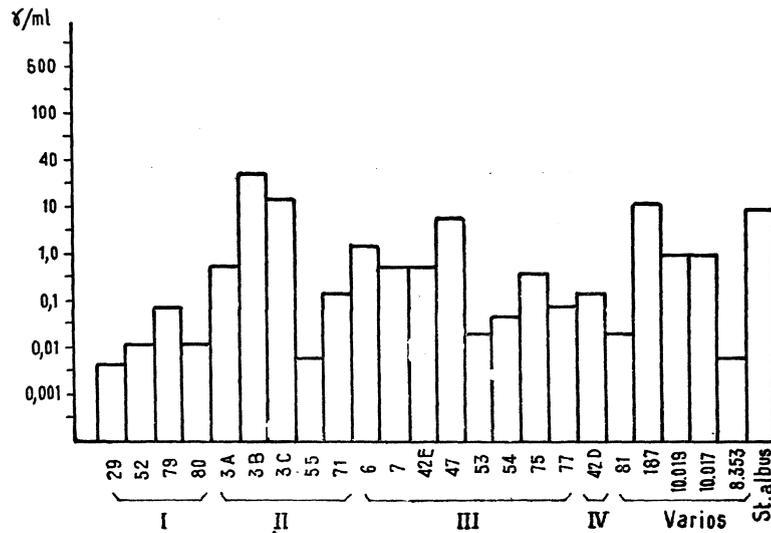


Figura 19

La *estreptomycina* actúa de forma parecida en casi todas las razas; son sensibles a 0,001-1  $\gamma$ /ml todas las razas, a excepción de 3B, 3C, 47, 87 y *Staphylococcus*, que necesitan de 10-40  $\gamma$ /ml.

La *tetraciclina*, a excepción de la raza 10.019, que se inhibe con 0,0001  $\gamma$ /ml; las otras necesitan cantidades de 0,001-0,5  $\gamma$ /ml, necesitando más las razas 54, 81, 80, 10.017, 79, 71 y 47; llegando la primera hasta las 40  $\gamma$ /ml.

Un derivado de la anterior, la *isonicotilmetiltetraciclina*, es menos activa que la anterior, necesitando entre 10-1  $\gamma$ /ml para inhibir todas las razas, a excepción de 71, 3B, 3C, 6, 47, 42D, 81 y 7, que llega a necesitar la primera hasta las 100  $\gamma$ /ml.

En relación con la *kanamicina*, todas las razas son sensibles, entre 0,5-25  $\gamma$ /ml, a excepción de las 3C, 55, 77 y 187, que necesitan hasta 40  $\gamma$ /ml.

Se ha realizado una prueba adicional de sensibilidad a la *bencilpenicilina* (36) al cabo de un año de realizar subcultivos sucesivos de las razas, para ver posibles cambios de sensibilidad. La mayoría de las razas no varían o lo hacen muy débilmente, pero otras, como las 3A,

Cuadro 8

Raza	Peni- cilina 1,5 U.I.	Estrep- tomicina 10 γ	Cloran- fenicol 10 γ	Tetra- ciclina 10 γ	Neo- micina 10 γ	Eritro- micina 10 γ	Olean- domicina 5 γ	Novo- biocina 5 γ	Nitro- furan- toina 200 γ	Baci- tracina 5 γ	Polimi- xina 10 γ	100 γ Sulfo- furazol
29	30,0	15,0	17,0	22,0	13,0	24,0	17,0	19,0	20,0	16,5	0,00	0,00
52	30,0	15,0	16,0	20,0	14,0	25,0	17,0	21,0	24,0	11,5	0,00	0,00
79	30,0	15,0	17,0	18,0	12,0	21,0	16,0	23,0	22,0	15,0	0,00	0,00
80	35,0	14,0	18,5	24,0	13,0	22,0	15,0	27,0	22,0	21,0	0,00	0,00
3A	24,0	16,0	18,5	20,0	14,0	23,0	19,0	19,0	21,0	0,00	0,00	0,00
3B	23,0	15,5	16,5	19,0	13,0	22,5	17,0	19,0	23,0	15,0	0,00	0,00
3C	33,0	15,5	17,5	21,0	15,0	23,0	17,0	20,0	25,0	12,0	0,00	0,00
55	28,0	14,5	16,0	20,5	14,0	25,0	18,0	24,0	22,5	0,00	0,00	0,00
71	26,0	14,5	17,5	19,0	13,0	22,0	18,0	22,0	22,0	0,00	0,00	0,00
6	26,0	15,5	18,0	20,0	13,0	23,0	18,0	22,0	25,0	14,0	0,00	0,00
7	24,5	14,5	16,0	17,5	14,0	23,0	17,0	21,0	22,0	12,0	0,00	0,00
53	17,0	15,0	18,5	22,0	13,0	26,0	19,0	22,0	23,5	13,0	0,00	0,00
54	0,00	15,0	18,0	22,5	13,0	25,5	21,0	24,0	25,5	13,0	0,00	0,00
42E	25,0	14,0	16,5	21,0	14,0	25,0	17,0	23,0	22,0	12,0	0,00	0,00
47	0,00	0,00	20,5	21,0	14,0	26,0	19,0	23,0	24,0	0,00	0,00	0,00
75	0,00	0,00	18,0	22,0	14,0	25,0	18,0	22,5	25,0	14,0	0,00	0,00
77	0,00	14,0	18,0	16,0	13,0	22,5	18,5	21,0	22,0	13,0	0,00	0,00
42D	31,5	14,5	18,5	22,0	14,5	25,0	17,0	25,0	25,0	14,5	0,00	0,00
187	0,00	12,0	14,5	17,0	11,5	19,0	14,0	20,0	17,5	11,0	0,00	0,00
81	0,00	13,5	16,0	0,00	13,0	22,0	16,0	21,5	20,0	12,0	0,00	0,00
10.019	23,0	13,0	14,0	16,5	12,5	18,5	14,5	20,0	20,0	11,0	0,00	0,00
10.017	0,00	0,00	18,0	21,0	13,5	24,0	15,0	21,0	24,0	13,0	0,00	0,00
8.353	31,0	16,5	17,0	20,0	13,0	22,0	17,0	19,0	19,5	16,5	0,00	0,00
<i>St. albus</i>	20,0	16,0	17,0	18,0	14,0	24,0	19,0	0,00	20,0	0,00	0,00	0,00

3B, 47, 187 y 10.019, aumentan la resistencia, mientras otras, como 29, 3C, 71, 42E, 54, 75 y, sobre todo, las 80, 10.017 y 55, disminuyen notablemente su resistencia.

c) *Pruebas de inhibición por difusión*

Se realizan por el método de los multidiscos, antes mencionado. Los resultados se expresan en milímetros de halo de inhibición formado en cada caso (*cuadro 8*).

En primer lugar, observamos que todas las razas son resistentes a la polimixina y al sulfofurazol.

En segundo lugar, todas las razas son sensibles a los antibióticos: cloranfenicol, neomicina, eritromicina, oleandomicina y nitrofurantoína. Estas pruebas *in vitro* indican que la eritromicina y después la nitrofurantoína, son los antibióticos más activos contra estas razas.

En tercer lugar, la sensibilidad hacia los otros antibióticos es variable: resisten a la penicilina (1,5 U.I.) las razas 54, 47, 75, 77, 187, 81 y 10.017; resiste a la tetraciclina (10  $\gamma$ ) la raza 81; resiste a la novobiocina (5  $\gamma$ ) el *Staphylococcus albus* y a la bacitracina (5  $\gamma$ ) las razas 3A, 55, 71, 47 y *St. albus*.

## DISCUSION

Son muy numerosos los trabajos sobre las propiedades fisiológicas en general o en particular del estafilococo, pero de todos ellos sólo encontramos el de Solomon y Sanclemente (29), referido a las propiedades de las razas de estafilococos propagadoras de bacteriófagos. Dicho trabajo se orienta preferentemente a la estandarización de dichos cultivos y al control de posibles mutaciones.

En el presente trabajo, aparte de ampliar algunas de las anteriores propiedades que consideramos de más interés, tanto cualitativa como cuantitativamente, tratamos de buscar ciertas posibles relaciones con la virulencia, al ver también propiedades comparativamente con el *Staphylococcus albus*, tratando a su vez de encontrar relaciones por la sensibilidad o resistencia hacia los antibióticos ordinarios.

### *Morfología del estafilococo*

Aunque Saganuma (32) encuentra una cierta relación entre el tamaño de las células y la producción de coagulasa, nosotros, derivado de observaciones al microscopio ordinario y al electrónico, no logramos detectar dicha relación y, por el contrario, encontramos la morfología de las diferentes razas bastante regular y homogénea.

### *Fisiología del estafilococo (cualitativa)*

El estafilococo, debido a su gran polifacetismo, posee propiedades fisiológicas variables, aunque de todas maneras podemos presentar algunas generalizaciones, en relación con alguna de sus propiedades fisiológicas.

Estamos de acuerdo con los autores en relación con la fermentación de unos azúcares (levulosa, sacarosa, maltosa y lactosa) y la no fermentación de otros (arabinosa y dextrina). Mossel (21) ha dado una gran importancia a la fermentación anaerobia del manitol, aunque nosotros encontramos una fermentación débil en las razas 55, 42E, 75 y 8.353 del *Staphylococcus aureus* y en el *St. albus*. Creemos que la fermentación de azúcares, tanto en condiciones aerobias como anaerobias, posee poco valor en cuanto a la diferenciación de razas virulentas, de avirulentas.

Relativo a las propiedades fundadas en reacciones enzimáticas, observamos que todas las razas probadas de *Staphylococcus aureus* y el *St. albus*, son productoras de catalasa y citocromooxidasa, así como no producen oxidasa, dentro de las enzimas de tipo respiratorio. Pero en estos mismos observamos que las razas de *St. aureus* producen deshidrogenasa y reducen el azul de metileno, lo cual no ocurre en el *St. albus* y, por lo tanto, puede servir de base de diferenciación de razas virulentas, de avirulentas.

En relación con enzimas de otro tipo, observamos que todas las razas estudiadas, no producen ni amilasas, ni desaminasas. Es significativo el hecho de que las razas de *Staphylococcus aureus*, producen lecitinasa, caseinasa, fosfatasa y desoxirribonucleasa, que no son producidas por el *St. albus*. No comentamos las enzimas ureasa, fibrinolisisina, penicilinasa y descarboxilasa, por ser muy variables en su producción, por lo que es difícil de establecer relaciones con la virulencia o el grupo serológico.

En relación con otras propiedades fisiológicas, podemos generalizar que todas las razas crecen en presencia de esculina y cianuro, pero no de hipurato. Son variables los crecimientos en presencia de citrato, cloruro sódico, cloruro mercúrico y en agar+telurito+glicina. Sin embargo, en este último medio, encontramos que puede tener interés si las condiciones de crecimiento se realizan a pH 6,8 y en anaerobiosis, pues crecen todas las razas de *Staphylococcus aureus*, a excepción de las 80 y 42D, así como el *St. albus*.

Por último, ninguna de las razas produce indol y sulfhídrico, pero son variables las reacciones de acetoina y rojo de metilo. Es significativo el que las razas de *Staphylococcus aureus*, además de producir coagulasa, reducen los nitratos y fermentan la leche tornasolada.

#### *Fisiología del estafilococo (cuantitativa)*

Los estafilococos en general crecen bien en los medios ordinarios de laboratorio y Allen y McWeigh (1) han estudiado la cinética de dicho crecimiento. También Solomon y Sanclemente (29) han determinado las curvas de crecimiento de las razas propagadoras de bacteriófagos del *Staphylococcus aureus*, en cultivo estático a 37 °C. Nosotros determinamos dicho crecimiento en agitación y en reposo. En el primer caso, el crecimiento es mejor, aunque lento, en las razas 6, 7 y 3A del *St. aureus* y en *St. albus*; en reposo, el *St. albus* también crece lentamente, así como la raza 80 del *St. aureus*; en las demás razas, el crecimiento es variable, siendo el óptimo a las nueve-quince horas. En todos los casos, el pH final está entre 5,2 y 6,5; únicamente llega a 7,0 en la raza 80 del *St. aureus*.

Todas las razas propagadoras de bacteriófagos producen fosfatasa ácida exocelular, en mayor o menor proporción; en cambio, esta enzima no es producida por el *Staphylococcus albus*. Por el contrario, esta última raza produce abundante pirofosfatasa celular, en tanto que las razas de *St. aureus* la producen en mucha menor proporción, pareciendo esta relación inversa tener carácter diferencial en cuanto al metabolismo del fosfato.

Todas las razas propagadoras de bacteriófagos producen desoxirribonucleasa exocelular y deshidrogenasa celular, enzimas ambas que no se logran detectar en el *Staphylococcus albus*. En cuanto a la actividad catalásica, encontramos que el *St. albus* produce doble cantidad que

la raza que más produce de *St. aureus*. La actividad gelatinásica exocelular, por el método que nosotros empleamos, sólo permite detectar actividad en cuatro razas, lo cual está en contradicción con los resultados obtenidos por otros autores, que la detectan en casi todas las razas.

Como se conoce, el *Staphylococcus albus* no produce coagulasa; enzima que constituye el principal carácter diferencial del *St. aureus*, aunque se duda si es factor activo de virulencia. Nuestros resultados cuantitativos difieren un tanto de los de Solomon y Sanclemente (29), aunque permiten seguir empleando este carácter como diferencia e indicador de patogenicidad.

Otra serie de experiencias cuantitativas se refieren al crecimiento de los estafilococos en citrato, cloruro sódico, cloruro mercúrico y laurilsulfato. El efecto del citrato ya lo había estudiado Rammel (23) y creía que su acción se debía al efecto complejante sobre los iones metálicos esenciales al crecimiento. Nosotros estudiamos el mismo efecto, pero ampliándolo a un mayor margen de pH y encontramos que resisten una mayor concentración del citrato a medida que elevamos el pH de 5,0 a 7,0, aunque sin poder establecer diferencias entre el *Staphylococcus aureus* y el *St. albus*.

El efecto del cloruro sódico lo estudiaron West y colaboradores (34), así como otros autores, que daban como propiedad diferencial del estafilococo su crecimiento en presencia de un 15 por ciento de cloruro sódico. Nosotros hemos encontrado que sólo resisten esta concentración las razas 3A, 47, 54, 75 y 10.017 del *Staphylococcus aureus*, por lo que pensamos que es difícil el establecer una generalización como la anteriormente expresada.

El efecto de las sales mercúricas sobre el estafilococo había sido estudiado por Smith (27) en relación con su virulencia, no encontrando relación evidente, conclusión a la que también llegamos nosotros después de un estudio cuantitativo de este ion sobre razas de estafilococos.

Por último, y en relación con el efecto del laurilsulfato, encontramos que en concentración de 1 mg/ml se inhiben todos los estafilococos, no influyendo en esta acción ni la temperatura ni el pH. Lambin y colaboradores (18) encuentran este efecto a concentración de 0,5 mg/ml, pero las condiciones experimentales difieren sensiblemente.

*Pruebas de sensibilidad a los antibióticos*

Después de no haber encontrado el efecto de inhibición cruzada de razas, que habían observado algunos autores, se estudia el efecto de los antibióticos ordinarios sobre las razas de estafilococo que se tratan en este trabajo.

Numerosos autores afirman que la mayor contribución a la quimioterapia de las infecciones estafilocócicas durante estos últimos años, ha sido el descubrimiento de las llamadas penicilinas semisintéticas derivadas del ácido 6-aminopenicilánico.

Nosotros estudiamos por el método de dilución seriada las siguientes: bencilpenicilina, 6-aminopenicilánico, dimetoxifenilpenicilina y  $\alpha$ -aminobencilpenicilina. De los resultados encontrados, podemos derivar el que las razas de *Staphylococcus aureus* que resisten más la bencilpenicilina, son las más sensibles a las otras penicilinas y en especial a la dimetoxifenilpenicilina, pero las que son sensibles a baja concentración de bencilpenicilina, lo son a mucho menos que la de las otras penicilinas.

Las razas de *Staphylococcus aureus* más resistentes a las penicilinas son 81, 187, 47, 54, 75 y 77, estas cuatro últimas del grupo serológico III. En estos casos se encuentra práctico el empleo de la dimetoxifenilpenicilina. Todas las razas resisten más de 0,1  $\gamma$ /ml de ácido 6-aminopenicilánico. Nuestros resultados relativos a la concentración mínima inhibidora de bencilpenicilina, están en relativo desacuerdo con los de Solomon y Sanclemente (29), aunque ellos observan como más resistentes las razas 81, 54, 75, 77 y 80. Para tratar de explicar alguna de estas diferencias, realizamos una determinación de sensibilidad a la bencilpenicilina después de un año de sucesivos subcultivos de las diferentes razas y observamos que así como algunas no varían o lo hacen débilmente, otras como las 3A, 3B y 47 aumentan su resistencia, mientras que las 55, 80 y 10.017 la disminuyen sensiblemente. Las razas primeramente señaladas continúan presentando una resistencia bastante estable.

En relación con la sensibilidad o resistencia a otros antibióticos, hemos encontrado que es relativamente baja la actividad de la kanamicina; resisten a 1  $\gamma$ /ml de estreptomycin, las razas de *Staphylococcus aureus*, 3B, 3C, 47 y 187, así como el *St. albus*; resisten la misma concentración

de tetraciclina, las razas de *St. aureus* 80, 54 y 81; siendo en cambio menos activo *in vitro* el derivado isonicotilmetiltetraciclina.

Por último, se realiza una prueba de sensibilidad a los antibióticos por el método de rutina en los laboratorios de análisis clínicos y con todas las razas propagadoras de bacteriófagos del *Staphylococcus aureus* y el *St. albus*. Observamos primeramente una resistencia general a la polimixina y al sulfofurazol; los antibióticos más activos parecen ser eritromicina, nitrofurantoína y novobiocina; después vienen oleandomicina, cloranfenicol y neomicina; en otros antibióticos, como penicilina, bacitracina, estreptomina y tetraciclina, se presentan casos de razas resistentes. Es de notar como caso curioso, la resistencia del *St. albus* hacia la novobiocina, a la que es muy sensible el *St. aureus*, por lo cual creemos debe realizarse un estudio particular de este caso.

#### RESUMEN

En el presente trabajo se ha realizado un estudio de las propiedades fisiológicas (cualitativa y cuantitativamente), así como de pruebas de sensibilidad a los antibióticos, de las razas propagadoras de bacteriófagos del *Staphylococcus aureus*, para compararlas con las propiedades fisiológicas y sensibilidad a los antibióticos del *St. albus*, orientado a encontrar caracteres diferenciales que puedan relacionarse con el origen de la virulencia del estafilococo.

Dejando aparte las propiedades que son comunes o variables, encontramos que las razas de *Staphylococcus aureus* producen deshidrogenasa, lecitinasa, caseinasa, fosfatasa, coagulasa y desoxirribonucleasa; reducen el azul de metileno y los nitratos; crecen en agar+telurito+glicina, en anaerobiosis (pH: 6,8) y fermentan la leche tornasolada. Ninguna de estas propiedades la posee el *St. albus*.

Una propiedad cuantitativa interesante es la de que existe una relación inversa en la producción de fosfatasa exocelular y pirofosfatasa celular (el *Staphylococcus aureus* produce abundante fosfatasa y poca pirofosfatasa, el *St. albus* produce mucha pirofosfatasa y ninguna fosfatasa); por otra parte, el *St. albus* produce doble cantidad de catalasa que las razas de *St. aureus*.

En relación con las pruebas de sensibilidad a los antibióticos, determinamos en relación con las penicilinas que las razas de *Staphylococcus*

*aureus* que resisten más a la bencilpenicilina son las más sensibles a otras penicilinas, especialmente a la dimetoxifenilpenicilina; en cambio, las razas más sensibles a la bencilpenicilina, lo son menos concentración que hacia las otras penicilinas. Por otro lado, observamos que con el tiempo y repetidos subcultivos, algunas razas no varían en sensibilidad, mientras que otras aumentan o disminuyen dicha sensibilidad hacia la bencilpenicilina.

Los antibióticos más activos contra los estafilococos, en general son: eritromicina, nitrofurantoína y novobiocina (sólo el *Staphylococcus albus* resiste a este antibiótico); vienen a continuación: oleandomicina, clo-ranfenicol y neomicina; viene después la kanamicina, y no tienen efecto: polimixina y sulfofurazol. Por supuesto, son activos: penicilina, estreptomycin, tetraciclina y bacitracina, pero varias razas son resistentes a ellos.

No encontramos relaciones entre las propiedades fisiológicas estudiadas y la sensibilidad a los antibióticos de las razas propagadoras de bacteriófagos del *Staphylococcus aureus* y el *St. albus*.

#### SUMMARY

In the present work, we study the physiological properties and also the antibiotic sensitivity of a set of phage-propagating strains of *Staphylococcus aureus* and a strain of *St. albus*, in order to find differential characters in probable relation with staphylococcal virulence.

We conclude that the characters in strains of *Staphylococcus aureus*, not present in the *St. albus*, are the following: dehydrogenase, lecithinase, caseinase, phosphatase, coagulase and DNA-ase activity; methylene blue and nitrate reduction; growth in agar-tellurite-glycine (anaerobiosis and pH: 6.8) and litmus milk fermentation.

We have seen that the strains of *Staphylococcus aureus* are phosphatase-rich and pyrophosphatase-poor, the *St. albus* on the contrary, have plenty pyrophosphatase and not phosphatase. In other respects, the *St. albus* yield twofold amount of catalase that the *St. aureus* strains.

Relating to the antibiotics sensitivity, we conclude that the strains of *Staphylococcus aureus* more resistent to the bencil-penicillin, are more sensitive to other penicillins, specially to the dimetoxiphenyl-penicillin. In other respects, the most sensitives strains to bencil-penicillin

are at smallest concentration that the other penicillins. We observe that after some time, several strains remain stables, as long as others increase or decrease its sensitivity to the bencil-penicillin.

The most actives antibiotics *in vitro* against all the above staphylococci, in general terms are: erithromycin, nitrofurantoin and novobiocin (only the *Staphylococcus albus* are resistant to this antibiotic), following by: oleandomycin, cloramphenicol, neomycin and after that the kannamycin. Without activity are: polymyxin and sulfofurazol. By the way, penicillin, streptomycin, tetracyclin and bacitracin, are active but some strains are resistents.

In conclusion, we do not get experimental evidence of relation between the physiological properties and the antibiotic sensitivity in strains phage-propagating of *Staphylococcus aureus* and *St. albus*.

#### BIBLIOGRAFIA

1. ALLEN, W. E., y McWEIGH, I. 1963. Growth of penicillin-resistant and penicillin-sensitive strains of *St. aureus*. Can. J. Microbiol., 9, 179.
2. BARBER, M. 1963. Development of drug resistance by staphylococci *in vitro* and *in vivo*. Intern. Rev. Cytol., 24, 267.
3. BARNES, E. H., y MORRIS, J. F. 1957. A quantitative study of the phosphatase activity of *Micrococcus pyogenes*. J. Bacteriol., 73, 400.
4. BAIRN-PARKER, A. C. 1963. A classification of micrococci and staphylococci based on physiological and biochemical test. J. Gen. Microbiol., 30, 409.
5. BAIRN-PARKER, A. C. 1965. The classification of staphylococci and micrococci from world-wide sources. J. Gen. Microbiol., 38, 363.
6. BARROW, G. I. 1963. Microbial antagonisms by *Staphylococcus aureus*. J. Gen. Microbiol., 31, 471.
7. BLAIR, J. E. 1958. Factors determining the pathogenicity of staphylococci. Ann. Rev. Microbiol., 12, 491.
8. BLAIR, J. E. 1962. What is a *Staphylococcus*? Bacteriol. Rev., 26, 375.
9. BLAIR, J. E., y WILLIAMS, R. E. O. 1961. Phage typing of staphylococci. Bull. World Health Organ., 24, 771.
10. BEINNING, P. R., y KENNEDY, E. R. 1963. Characteristics of a strain of *Staphylococcus aureus* grown *in vivo* and *in vitro*. J. Bacteriol., 85, 732.
11. BURNS, J., y HOLTMAN, D. F. 1960. Biochemical properties of virulent and avirulent staphylococci. Ann. N. Y. Acad. Sci., 88, 1.115.
12. COWAN, S. T. 1962. An introduction to chaos of the clasification of micrococci and staphylococci. J. Appl. Bacteriol., 25, 324.

13. DÍAZ, R.; CHORDI, A.; RODRÍGUEZ-BURGOS, A., y TORMO, J. 1964. Estudio sobre ocho características del *Staphylococcus* relacionadas con la patogenicidad. Microbiol. Españ., 17, 167.
14. ELEK, S. D. 1959. *Staphylococcus pyogenes* and its relation to disease. E & S Livingstone Ltd.
15. GABY, W. L., y FREE, E. 1958. Differential diagnosis of *Pseudomonas* like microorganisms in the clinical laboratory. J. Bacteriol., 76, 442.
16. GHOSH, D., y BORKAR, P. S. 1961. Studies on penicillinase. Hindustan Antibiot. Bull., 3, 85.
17. KAVANAGH, F. 1963. Analytical Microbiology, 125. Academic Press.
18. LAMBIN, S.; GERMAN, A., y BERNARD, J. 1961. Etude des modalités d'action de quelques substances bacteriostatiques sur *St. aureus* par le methode des courbes de croissance. Ann. Inst. Pasteur, 100, 427.
19. LEVINSON, H. S.; SLOAN, J. D., y HYATT, M. T. 1958. Pyrophosphatase activity of *Bacillus megaterium* spore and vegetative cell extracts. J. Bacteriol., 75, 291.
20. Manual Oxoid. 1961. Londres.
21. MOSSEL, D. A. 1962. Attempts in classification of catalase-positive staphylococci and micrococci. J. Bacteriol., 84, 1.140.
22. RALSTON, D. J., y BAER, B. S. Inhibitory action of phage K on staphylococcal dehydrogenases. J. Bacteriol., 86, 666.
23. RAMMELL, G. G. 1962. Inhibition by citrate of the growth of coagulase-positive staphylococci. J. Bacteriol., 84, 1.123.
24. RICHOV, R.; QUINCHON, C., y RICHOV, Mme. 1962. Sur les propriétés enzymatiques des toxines estaphylocociques. Ann. Sclavo, 4, 90.
25. ROUNTREE, P. M. 1963. The origin and spread of virulent staphylococci. Recent Progr. Microbiol., 561.
26. SHAW, C.; SMITH, J. M., y COWAN, S. T. 1951. Staphylococci and their classification. J. Gen. Microbiol., 5, 1.010.
27. SMITH, P. B. 1962. Growth of staphylococci on mercuric chloride agar. J. Bacteriol., 84, 1.016.
28. SMITH, W., y HALE, J. H. 1944. The nature and mode of action of *Staphylococcus coagulase*. Brit. J. Exptl. Pathol., 25, 101.
29. SOLOMON, J. J., y SANCLEMENTE, C. L. 1963. Some physiological characteristics of two sets of phage-propagating strains of *Staphylococcus aureus*. Appl. Microbiol., 11, 36.
30. STEEL, K. J. The oxidase activity of staphylococci. J. Appl. Bacteriol., 25, 445.
31. STONE, A. B., y BURTON, K. 1962. Synergistic effects in the activation of a streptococcal DN-ase by bivalent metal ions. Biochem. J., 83, 492.
32. SUGANUMA, A. 1962. Some observations on the fine structure of *St. aureus*. J. Infect. Diseases, 111, 8.
33. VAAMONDE, R., y REGUEIRO, B. 1960. Manual de laboratorio para Microbiología aplicada.

34. WEST, B.; FLORENCE, C. K., y SHIELDS, D. A. 1963. Effect sodium chloride on *Staphylococcus*-phage relationship. J. Bacteriol., 86, 773.
35. WILSON, G. S., y ATKINSON, J. D. 1945. Typing of staphylococci by the bacteriophage method. Lancet, 1, 647.
36. WILLIAMS, R. E. O. 1963 Healthy carriage of *Staphylococcus aureus*: its prevalence and importance. Bacteriol. Rev., 27, 56.

FACULTAD DE FARMACIA DE GRANADA  
CATEDRA DE MICROBIOLOGIA  
ESCUELA NACIONAL DE SANIDAD  
CENTRO NACIONAL DE SALMONELOSIS

## ESTUDIO SEROLOGICO DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORES DE INFECCIONES EN LAS VIAS URINARIAS

por

A. RAMOS, J. RUIZ-MERINO y V. CALLAO

### INTRODUCCION

Es admitido por la mayoría de los autores [O'Sullivan y colaboradores (7), entre otros] que la mayoría de las infecciones en las vías urinarias corresponden al *Escherichia coli*. Ciertas divergencias observadas en el comportamiento bioquímico de distintas cepas de gram-negativos, considerados como *E. coli*, aislados en infecciones urinarias, nos han llevado a estudiar estos gérmenes bajo el punto de vista antigénico, con el fin de poder consignar si tales diferencias bioquímicas se correspondían con diferencias antigénicas, a la par que relacionar esas propiedades serológicas con otros aspectos ligados a las infecciones urinarias ocasionadas por *E. coli*.

### MATERIAL Y METODOS

Los gérmenes fueron, todos ellos, aislados en orinas infectadas conteniendo más de 100.000 gérmenes/ml, y se clasificaron como *Escherichia coli*, siguiendo en todo momento la sistemática de Bergey (1), la

descripción de Kaufmann (5) y los datos recopilados por Sedlak y Rische (10).

La tipificación de los citados gérmenes se hizo siguiendo la pauta general de determinación serológica con sueros monoespecíficos O; y una vez incluida la estirpe en el grupo O se determina el K y el H; así como con los once antisueros OB de que dispone el Centro Nacional para la clasificación serológica: O26:B6 ; O55:B5 ; O86:B7 ; O111:B4 ; O112:B11 ; O119:B14 ; O124:B17 ; O125:B15 ; O126:B16 ; O127:B8, y O128:B12.

### RESULTADOS

En el *cuadro 1* consignamos el número de *Escherichia coli* pertenecientes a cada tipo serológico, así como exponemos los datos correspondientes a cada sexo; prácticamente puede decirse que no hubo diferen-

*Cuadro 1. Tipos serológicos encontrados en orinas infectadas y relación posible con el sexo de las personas afectadas*

Serotipo	Número de <i>E. coli</i> encontrados			
	Varones	Hembras	Total	Porcentaje
O26:B6	9	26	35	18,1
O55:B5	2	1	3	1,5
O111:B4	0	1	1	0,5
O119:B14	0	2	2	1,0
O126:B16	0	3	3	1,5
O127:B8	1	2	3	1,5
O128:B12	1	1	2	1,0
O-1	1	5	6	3,1
O-2	0	5	5	2,6
N.T.R. (*)	6	9	15	7,7
N.T.S. (**)	28	93	121	61,5
<b>Totales</b>	<b>48</b>	<b>148</b>	<b>196</b>	<b>100,0</b>

(\*) No tipificados por haber sido aislados en fase rugosa.

(\*\*) No tipificados, pese a encontrarse en fase lisa, por no corresponder al tipo de sueros ensayados.

cias apreciables. El tipo serológico más frecuente fue el O26:B6, con casi un 20 por ciento de la totalidad de *E. coli*. No se aisló ningún *E. coli* de los tipos O86:B7 ; O112:B11 ; O124:B17, y O125:B15. Con los demás sueros se hallaron *E. coli* de los otros tipos serológicos ensayados, pero siempre en número inferior.

En el *cuadro 2* se indica la relación existente entre el germen y el proceso nosológico observado; tampoco aquí se pudieron apreciar diferencias notables en la frecuencia de los tipos y los síntomas de los enfermos.

*Cuadro 2. Posible relación existente entre el tipo serológico de Escherichia coli y la localización de la lesión*

Serotipo	Número de <i>E. coli</i> aislados			
	Vesicales	Renales	Uretrales (*)	Sin diagnóstico (**)
026:B6	16	6	1	12
055:B5	2	0	0	1
0111:B4	1	0	0	0
0119:B14	1	0	0	1
0126:B16	2	1	0	0
0127:B8	1	1	0	1
0128:B12	1	0	0	0
0-1	3	1	0	2
0-2	1	4	0	0
N.T.R.	5	3	1	6
N.T.S.	20	12	3	89
Totales	53	30	5	108

(\*) Dos fueron prostatitis y tres, uretritis.

(\*\*) Las fichas consultadas carecían del correspondiente diagnóstico clínico.

Sin embargo, se aprecia claramente un predominio general de las infecciones vesicales sobre las renales o uretrales; sin que ningún tipo serológico tenga significación especial, debido a la baja cifra de *Esche-*

*richia coli* pertenecientes a tales serotipos. Sólo existió un grupo, el 0-2, en el que el predominio de las infecciones renales fue algo manifiesto, pero como ya apuntamos, el número de cepas aisladas que se corresponden con este tipo fue de tan solo cinco, lo que no permite sacar conclusiones en tal respecto.

En el *cuadro 3* anotamos las anomalías bioquímicas de los gérmenes que podíamos haber separado, en nuestra clasificación del *Escherichia coli*, pero que por corresponderse en todas las demás pruebas bioquímicas con esta especie nos hizo incluirlos como tales; estas anomalías fueron la utilización de los citratos en el medio de Koser y la licuación de la gelatina. En los gérmenes no tipificados también observamos diferencias, pero que, precisamente por no haber conseguido su clasificación serológica, no hemos incluido.

*Cuadro 3. Anomalías bioquímicas en el comportamiento de Escherichia coli tipificados serológicamente*

Serotipo	Número de gérmenes	Anomalía observada
0126:B16	1	Crecen en koser
026:B6	1	Crecen en koser
0-1	1	Licúan la gelatina

#### COMENTARIOS Y DISCUSION

Por haber sido realizadas las tomas de muestras en enfermos de Granada, merece destacarse el hecho de la mayor frecuencia correspondiente al serotipo O26:B6, que nos hace considerar a tal tipo como endémico en la provincia de Granada, pues ya ha sido encontrado anteriormente por Callao y Henares (2), quienes lo aislaron de heces. Hecho, que también debe ser considerado, pues Turck y Petersdorf (11) apuntan que la flora coliforme, que muchas veces infecta las vías urinarias, podía tener su origen en la flora intestinal.

Consideramos que no existe predominio serológico de ningún tipo bajo el punto de vista general de infecciones urinarias por *Escherichia*

*coli*, pues en los distintos trabajos realizados por diferentes autores (3, 8 y 12), incluyendo el presente trabajo, no existe relación manifiesta. El hecho de que nosotros hayamos encontrado como más frecuente el tipo O26:B6, es por las razones anteriormente argumentadas de haber realizado el estudio en Granada.

Tampoco se ha apreciado predominio en relación con el sexo, pues aunque las cifras en las hembras sean superiores a las encontradas para los varones, es rasgo general de las infecciones en vías urinarias, hecho que ya apuntamos anteriormente (8); señalando la pequeña diferencia de que hemos encontrado más acentuada ésta para el *Escherichia coli* que para los demás gérmenes gram-negativos. Concretamente, fue del 67,79 por ciento la cifra de hembras con infecciones de vías urinarias por gram-negativos, y de 75,48 por ciento la de infectadas por el *E. coli*.

En general, las infecciones urinarias por *Escherichia coli* tienen un predominio vesical, sin que este rasgo corresponda a ningún tipo serológico en especial, pues en todos ellos (con excepción del O-2) existió tal predominio.

Una dificultad en nuestra clasificación fue la de encontrar rasgos bioquímicos no coincidentes con las características generales del *Escherichia coli*. Henares (4) también hace constar la licuación de la gelatina por *E. coli* perfectamente tipificados serológicamente y que se corresponden con el O26:B6; nosotros hemos hallado esta característica, aunque en un tipo serológico distinto, el O-1. Además, hemos encontrado otro rasgo hasta ahora no descrito por ningún autor, y es la utilización del citrato en el medio de Koser; concretamente, dos gérmenes tipificados tenían esta característica, se corresponden con los tipos O126:B16 y O26:B6. Esta misma diferencia fue hallada en gérmenes que no pudieron ser tipificados con nuestros sueros; así como también encontramos *E. coli* ureasopositivos, que puede que pertenezcan a tipos nuevos, pues Orskov y colaboradores (6) describen a los tipos K87 y K88 como ocasionalmente ureasopositivos.

#### RESUMEN

Se realiza un estudio antigénico y bioquímico de *Escherichia coli* aislados en infecciones urinarias, encontrándose como serotipo más frecuente el O26:B6, y quedando un número elevado de gérmenes sin clasificar.

No existieron diferencias serológicas en relación con el sexo, aunque se apreció un predominio general de infección en mujeres. Igualmente respecto a la sintomatología de la lesión con predominio vesical.

Se observaron dos diferencias bioquímicas destacables en algunos de los *Escherichia coli* tipificados: la licuación de la gelatina y el desarrollo en el medio de Koser como única fuente de carbono.

#### SUMMARY

A serological and biochemical study was made of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections, the most frequent serotype being O26:B6 among a large number of other unclassified types.

There were no significant serological differences in relation to sex although there was a prevalence of infection in women. Similarly there were no differences in simptomatology of the lesions which were prevalently vesical.

Two marked biochemical differences were observed in some of the typed *Escherichia coli*: the liquefaction of gelatine and growth in Koser's medium as the only source of carbon.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 1957. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
2. CALLAO, V., y HENARES, M. 1955. Brote epidémico de enteritis disenteriforme ocasionada por el colibacilo serotipo 26B6. Rev. Ibérica Parasitol, Libro-Homenaje López-Neyra, 911.
3. GEACHIE, J. Mc. 1965. Serological grouping of urinary *Escherichia coli*. J. Clin. Pathol., 18, 428-31.
4. HENARES, M. 1964. Bacteriología de las diarreas infantiles. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia de Granada.
5. KAUFMANN, F. 1954. Enterobacteriaceae. Ejnar Munksgaard Publisher, Copenhagen.
6. ORSKOV, I.; ORSKOV, F.; SOJKA, W. J., y LEACH, J. M. 1961. Simultaneous occurrence of *E. coli* B and L antigens in strains from diseased swine. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 53, 404-21.
7. O'SULLIVAN, D. J.; FITZGERALD, M. G.; MEYNELL, M. J., y MALINS, J. M. 1961. Urinary tract infection. A comparative study in the diabetic and general populations. Brit. Med. J., 1, 786.

8. RAMOS, A. 1964. Estudio bacteriológico de las infecciones urinarias producidas por gérmenes gram-negativos en la provincia de Granada. *Ars. Pharm.*, 6, 387-402.
9. RANTZ, L. A. 1962. Serological grouping of *Escherichia coli* study in urinary tract infection. *Arch. Internal Med.*, 109, 37.
10. SEDLAK, J., y RISCHE, H. 1961. *Enterobacteriaceae-Infektionen*. Veb Georg Thieme, Leipzig.
11. TURCK, M., y PETERSDORF, R. G. 1962. The epidemiology of non-enteric *Escherichia coli* infections: prevalence of serological groups. *J. Clin. Invest.*, 41, 1.760.
12. VAHLNE, G. 1945. Serological typing of the colon bacteria with special reference to the occurrence of *B. coli* in man under normal and pathological conditions particularly in epididimitis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (supl.)*, 62, 217.

C. S. I. C.  
ESTACION EXPERIMENTAL DEL ZAIDIN. GRANADA

## PRODUCCION DE TOXOHORMONA POR LEVADURA DE PANADERIA

por

J. OLIVARES, V. CALLAO y E. MONTOYA

### INTRODUCCION

Hace algunos años, Callao y Montoya (2) y Mifuchi y colaboradores (6) demostraron que las mutaciones de levadura con deficiencia respiratoria producen sustancias del tipo de la toxohormona cancerosa (TH), en contraste con las razas normales que carecen de dicha propiedad. Recientemente, no obstante, encontramos que algunos extractos de levadura normal de panadería poseían cierta actividad de TH y al examinar estos resultados, se comprobó que en todos los casos, dichos extractos procedían de levaduras que habían sufrido un proceso más o menos intenso de autólisis. Ante este hecho, se creyó oportuno realizar una serie de experiencias con el objeto de comprobar si existe alguna relación entre los fenómenos de autólisis de la levadura y la producción de TH.

### MATERIAL Y METODOS

#### *Autolizados de levaduras*

Se prepararon suspendiendo 50 g de levadura de panadería seca al aire en 250 ml de agua destilada e incubando la mezcla, bajo tolueno, a 37 °C durante un tiempo variable, según el tipo de experiencia.

*Extracción de toxohormona*

La autólisis se interrumpió añadiendo 750 ml de etanol hirviendo; a continuación, la mezcla se extrajo a reflujo durante treinta minutos al baño María con agitación continua. Después de fría, la suspensión fue filtrada y el residuo insoluble, exprimido, fue suspendido en 500 ml de agua destilada y extraído durante una hora a 100 °C. La mezcla fue centrifugada y el sobrenadante, concentrado al vacío a 1/10 de su volumen primitivo, se precipitó con dos volúmenes de etanol. El precipitado obtenido, lavado con etanol y desecado al vacío, fue purificado mediante extracción con acético glacial y precipitación con éter, según el procedimiento de Yunoki y Griffin (7).

*Valoración de la actividad de toxohormona*

Se utilizó para ello la propiedad que tiene la TH de inhibir el desarrollo de la raza inestable de levadura R6U2 en medios con lactato como única fuente de carbono (8).

Cada una de las preparaciones purificadas se disolvió en el medio de cultivo a concentraciones comprendidas entre 1 y 50 mg/ml. Se tomaron muestras de 2 ml de cada dilución, que después de colocadas en tubos fueron esterilizadas a 110 °C e inoculadas con 0,1 ml de una suspensión de levadura R6U2 procedente de un cultivo de veinticuatro horas y con una concentración de 2 millones de células/ml. Los tubos se incubaron a 30 °C con agitación continua durante veinticuatro horas, al cabo de las cuales se determinó el contenido en células de levadura de cada uno de los tubos. En todas las determinaciones se incluyeron controles libres de TH.

Se consideró como dosis mínima activa, la cantidad de TH que disuelta en 1 ml de medio de cultivo inhibió en un 50 por ciento el desarrollo de la levadura inestable, en las condiciones descritas.

Los resultados obtenidos por este método se confirmaron por inyección de las fracciones obtenidas a ratones y valoración de la catalasa hepática de los mismos, según la técnica descrita en anteriores publicaciones (2-3). La actividad catalásica se valoró por el método de Bonnichsen y colaboradores (1) y se expresó como «Kat. f» (\*): velocidad de la reacción/minuto, dividida por el peso seco de la preparación, en gramos.

(\*) Actividad catalásica, según Euler y Josephson (4).

*Control de levadura normal sin autolizar*

Se preparó a partir de una raza de levadura normal de panadería aislada en nuestro laboratorio (*Saccharomyces cerevisiae*, raza S<sub>16</sub>). La levadura, procedente de un cultivo de veinticuatro horas en un medio semisintético, se desecó con acetona, se suspendió en 20 volúmenes de etanol + agua (3:1, v/v) y se extrajo por el procedimiento anteriormente indicado.

*Control de levadura con deficiencia respiratoria, sin autolizar*

Se preparó a partir de una mutación con deficiencia respiratoria (raza T<sub>19</sub>) obtenida por tratamiento con tripaflavina (2), de la raza S<sub>16</sub> de *Saccharomyces cerevisiae*. El procedimiento fue el mismo que en el caso anterior.

## RESULTADOS

En el *cuadro 1* se muestra el efecto de la TH purificada procedente de un autolizado de levadura sobre el crecimiento en lactato de la raza inestable R6U2 y sobre el nivel de catalasa hepática del ratón, en comparación con el de las fracciones correspondientes procedentes de levadura normal y DR sin autolizar. Los resultados son la media de diez experiencias.

Como puede observarse, el ensayo fue francamente positivo para las fracciones procedentes de levadura DR y de autolizados de levadura normal, y negativo para la obtenida de levadura normal sin autolizar. En todos los casos se comprobó la ausencia de contaminaciones bacterianas.

Los rendimientos en TH de los autolizados de levadura en función del tiempo de autólisis vienen expresados en el *cuadro 2*.

## DISCUSION

Los datos obtenidos confirman de acuerdo con resultados anteriores (2 y 6) que en la levadura de panadería normal no puede ponerse de manifiesto, al menos con las técnicas empleadas, ningún factor con

Cuadro 1. Actividad de toxohormona de fracciones procedentes de levadura normal, levadura con deficiencia respiratoria (DR) y autolizados de levadura normal

Fracción ensayada	Tiempo de autólisis Horas	Ensayos sobre R6U2 (*)		Ensayos sobre ratón (*)	
		Concentración mg/ml	Crecimiento millones/ml	Dosis inyectada mg/ratón	Catalasa hepática (Kat. f.)
Ninguna (testigos)			4,60		60,1 ± 3,00
Procedentes de:					
Levadura normal	0	30	4,20	30	57,8 ± 2,33
Levadura DR	0	30	0,50	30	41,4 ± 4,21 (**)
Autolizado de levadura	12	30	0,72	30	45,3 ± 1,90 (**)

(\*) Véase el texto.

(\*\*) Significativamente diferente de los testigos (P < .001).

Cuadro 2. Rendimiento en toxohormona de autolizados de levadura de panadería en función del tiempo de autólisis

Procedencia del autolizado	Tiempo de autólisis Horas	Rendimiento (*) Gramos	Mínima dosis activa (**) Miligramos
Levadura fresca	0,0	0,150	> 50
Levadura seca al aire	0,0	0,370	30
Levadura seca al aire	0,5	0,590	20
Levadura seca al aire	1,0	0,400	15
Levadura seca al aire	3,0	0,510	15
Levadura seca al aire	6,0	0,610	15
Levadura seca al aire	12,0	0,820	20
Levadura seca al aire	24,0	0,840	20
Levadura seca al aire	48,0	0,870	20
Levadura seca al aire	72,0	1,100	15
Levadura seca al aire	96,0	1,450	10
Levadura seca al aire	120,0	0,800	15
Levadura seca al aire	144,0	0,670	15

(\*) Gramos por 100 de levadura seca a 105 °C.

(\*\*) Véase el texto.

actividad de toxohormona. Por el contrario, cuando la misma levadura se deseca y se somete a un proceso de autólisis, se puede extraer de ella una cantidad bastante apreciable —un 1,5 por ciento— de una fracción con las mismas propiedades que la TH en relación con el crecimiento en lactato de la raza R6U2 de levadura y la actividad de la catalasa hepática del ratón. Dado que en ningún caso se ha podido apreciar la existencia de contaminaciones bacterianas en los autolizados, hay que desechar la posibilidad de que la TH encontrada pueda estar producida por algunas de las bacterias a que Kampschmidt y Schultz (5) atribuyen su producción en los tumores.

De otra parte, los estudios de rendimientos parecen indicar que la

cantidad de TH es proporcional al tiempo de autólisis, alcanzando el máximo a las noventa y seis horas de iniciada la misma.

De todo ello parece deducirse, por tanto, que en el caso de la levadura de panadería y en las condiciones en que se ha operado, la producción de TH es un fenómeno ligado a la autólisis celular.

En nuestra opinión, y dada la confusión que hoy día existe sobre el tema, merecería la pena investigar la posibilidad de que la TH de los tumores tuviera su origen en procesos de autólisis de las células malignas o de los tejidos invadidos por ellas.

#### RESUMEN

Se ha demostrado que cuando se somete a un proceso de autólisis una levadura de panadería y en ausencia de contaminaciones bacterianas, se pueden extraer de los autolizados fracciones con actividad de TH. El máximo rendimiento —1,45 g por cien de levadura seca— se obtuvo después de noventa y seis horas de autólisis. Ninguna actividad pudo ser demostrada en extractos de la levadura sin autolizar. Se sugiere la posibilidad de que la producción de TH por tejidos malignos pueda deberse a un fenómeno de autólisis.

#### SUMMARY

Brewer's yeast submitted to an autolysis process yielded autolyzates from which it was possible to extract toxohormone-like fractions. 1.45 g per cent of dry yeast were obtained after 96 hours of autolysis. No toxohormone activity could be proved from non-autolyzated yeast extracts. It is suggested that TH production in tumor growing organisms could be a consequence of autolysis phenomenon.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BONNICHSEN, R. K.; CHANCE, B., y THEORELL, H. 1947. Catalase activity. *Acta Chem. Scand.*, 1, 685.
2. CALLAO, V., y MONTOYA, E. 1961. Toxohormone-like factor from microorganisms with impaired respiration. *Science*, 134, 2.041.

3. CALLAO, V.; OLIVARES, J., y MONTOYA, E. 1963. Toxohormone inhibitory effect on the growth of an unstable strain of yeast. *Science*, 142, 1.668-69.
4. EULER, H. VON, y JOSEPHSON, K. 1923. *Chem. Ber.*, 56, 1.749. En D. GLICK (ed.). 1957. *Methods of biochemical analysis*, 1, 362. Interscience Publishers, Nueva York.
5. KAMPSCHMIDT, R. F., y SCHULTZ, G. A. 1963. Absence of toxohormone in rat tumors free of bacterial contamination. *Cancer Res.*, 23, 751-55.
6. MIFUCHI, I.; HOSOI, M.; YANAGIHARA, Y, y NISHIDA, M. 1963. Studies on the toxohormone-like substances in the respiration-deficient mutant of *Saccharomyces cerevisiae* induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Gann*, 54, 205-11.
7. YUNOKI, K., y GRIFFIN, A. C. 1960. Purification of toxohormone by column chromatography. *Cancer Res.*, 20, 533-40.

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

## KILLED FOWL PLAGUE VIRUS VACCINE OBTAINED FROM CHICK EMBRYO CELLS (\*)

by

E. RONDA, A. GARCIA-GANCEDO, M.<sup>a</sup> LUISA ALONSO, PILAR VILAS  
and LOURDES LUCAS

### INTRODUCTION

After our studies on the behaviour of fowl plague virus (FPV) propagated in several kinds of cells (14), we have considered it interesting to determine the immunizing power of this virus multiplied in said cells.

A well known fact is the numeric predominance which vaccines prepared from amniotic-allantoic fluid have to date over against vaccines obtained in culture of chick embryo cells; it is not possible to find an explication to the omission of works leading to obtainment of vaccines against fowl diseases, prepared from tissue culture. The works of Bankowski and cols (2-4) and Huygelen and Peetermans (8) on vaccines against the Newcastle disease are demonstrative enough of the success achieved by vaccines proceeding from cell cultures.

The phenomenon of loss of lethal power for chick embryo by passage of the FPV on HeLa cells, studied by us (14), makes interesting the investigation of the immunologic behaviour of this attenuated virus.

---

(\*) This work was supported by research grant N.º FG-Sp-122 from the U. S. Department of Agriculture and a communication was submitted to the IX International Congress of Microbiology, Moscow 1966 under the title «Vaccin contre la peste aviaire classique préparé à partir de cellules d'embryon de poulet inactivé par la beta-propiolactone».

We attach a great value, for the preparation of vaccines with inactivated virus, to the activity of the beta-propiolactone whose viricide effects were demonstrated by Hartman and cols. (5-7) and Lo Grippio and cols (10-12) with results superior to the obtained with other substances.

Since Ramon's (13) studies, it is well known that oleous adjuvants reinforce the immunizing power and the superiority of oleous vaccines over aqueous ones, as demonstrated by Jacotot (97) and Balducci (1) as well as many other authors among which Salk stands out (15-17). Accordingly with these investigations, one of the best adjuvants is Bayol F (white oil) mixed with Arlacel A (mannide monoleate) as an emulsifier.

## MATERIAL AND METHODS

### *Viruses*

KP virus: Klassische Peste.

The Rostock strain of fowl plague virus was received as a material from the 68th egg passage from Dr. Schäffer, Max Planck Institut für Virusforschung, Tübingen. Fresh stock virus was obtained by weekly passage of diluted virus ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , 50 per cent egg lethal dose (ELD<sub>50</sub>) in embryonated eggs by inoculating 0.1 ml by allantoic route.

Viruses utilized for preparation of vaccines.—FPV multiplied in chick embryo cells in the 30th passage in these cells.

FPV multiplied in HeLa cells in the tenth passage. On the 10th passage, this virus was not hemagglutinant; it did not present any lethal power against chick or chick embryo.

*Challenge virus in vaccination tests.* Infected allantoic fluid. The challenge dose was always of 10,000 50 per cent chick lethal doses (CLD<sub>50</sub>) in 1 ml.

In all viruses, titration 50 per cent point was determined by the method of Reed and Muench.

### *Cells*

HeLa strain obtained from Italdiagnostic Laboratories of Rome, Italy. These cells are kept at a continuous proliferation.

*Chick embryo cells.* To obtain these cells, we have employed ten-days-old embryos. The head, limbs and viscera were eliminated; the

embryos were washed four times with Hank's and minced with scissors. They were then mixed with trypsin (0.2 per cent in Hank's) and treated with the magnetic agitator for 30 minutes at 37 °C. The trypsin containing the cells in suspension is collected and centrifugated for ten minutes at 1000 r/m. The sediment is washed thrice with Hank's, centrifugating each time for ten minutes at 1,000 r/m and vigorously pipetting in order to disgregate cells aggregates after each centrifugation.

After the last washing and pipetting, the suspension was filtered through sterile gauze to eliminate clumps of cells. The cells were counted and the volume adjusted to about  $2 \times 10^5$  cells per ml. They were immediately put in Roux flasks of Pyrex glass.

#### *Culture media*

As a growth medium for HeLa cells, we have employed the following:

Hank's solution, 75 per cent  
Lactalbumin hydrolisate, 10 per cent  
Human serum, 15 per cent

Added to this medium:

Phenol red (in sol. 0.2 per cent) 1 per cent  
Penicillin, 100 I.U.  
Streptomycin, 100  $\mu$ g/ml  
Nystatin, 20 I. U./ml  
Sodium bicarbonate, 1 per cent (sol. 8.4 per cent).

Maintenance medium:

Hank's solution, 85 per cent  
Lactalbumin hydrolisate, 10 per cent (sol. of 10 per cent)  
Rabbit serum, 3 per cent

Phenol red, penicillin, streptomycin, nystatin and sodium bicarbonate are employed in the same proportion as in the above formula.

For chick embryo cells, the following growth medium was employed:

Hank's solution, 79 per cent  
Lactalbumin hydrolisate (enzymatic), 10 per cent

Calf serum, 10 per cent  
Phenol red (0.2 per cent), 1 per cent  
Penicillin, 100 I.U./ml  
Streptomycin, 100 g/ml  
Nystatin, 20 I.U./ml  
Sodium bicarbonate to adjust at pH = 7.2.

As a maintenance medium, we have employed the following:

Hank's solution, 94 per cent  
Lactalbumin hydrolysate (enzymatic), 5 per cent  
Phenol red (0.2 per cent), 1 per cent  
Penicillin, 100 I.U./ml  
Streptomycin, 100 g/ml  
Nystatin, 20 I.U./ml  
Sodium bicarbonate to adjust at pH = 7.2.  
3 per cent of calf serum was added immediately before using.

#### *Animals*

We have employed in our experiments:

Leghorn chickens born in the incubators in our laboratory.

Three-months-old rabbits of 2 kg average weight.

Ten-days-old embryonated eggs incubated in our laboratory.

#### *Biological tests*

##### *Hemagglutination (HA).*

*Chicken's red blood cells.* Obtained by intracardiac puncture in hens, the blood is added to the same quantity of Alserver's solution and washed thrice with veronal buffer solution (1/5 in distilled water) by centrifugation, at 1,000 r/m for 5 minutes. The erythrocytes are conserved at 4 °C; diluted to 0.25 per cent in veronal buffer solution (1/5).

*Virus suspensions.* The infected mediums proceeding from the two types of cells we have worked with have been thrice frozen and thawed, after centrifugated at 1,000 r/m for 5 minutes. The infected allantoic fluid was centrifugated during 5 minutes at 1,000 r/m.

We employ the plaques of excavated plastic perspex used for hemagglutination. Twofold dilutions of the virus suspension were made in veronal buffer solution (1/5 in distilled water). The reading was made

an hour later at 4 °C. All titers are expressed as the reciprocal of the final dilution of the original virus suspension.

#### *Inhibition of the hemagglutination (HI)*

The alpha method for HI tests was used.

Infected allantoic fluid centrifugated for 5 minutes at 1,000 r/m and conserved at -20 °C has been utilized as virus in the reaction. Sera have been inactivated at 56 °C for 30 minutes and diluted to 1/5 in veronal buffer solution (1/5 in distilled water). The excavated plastic plaque was employed in the reaction. 0.25 ml of twofold dilutions of the virus suspensions were made in veronal solution (1/5 in distilled water). 0.25 ml of the diluted serum were added to each dilution of the virus; the mixtures serum—virus were incubated for 40 minutes at laboratory temperature; 0.25 ml of the red cells suspension at 0.5 per cent in veronal solution were added. Reading was made at 4 °C an hour later.

The serum titer is expressed by the inverse of the dilution of the virus in which the hemagglutination was completely inhibited.

The HI titre is calculated by the following formula:

$$\frac{\text{Virus titer}}{\text{Serum titer}} \text{ serum dilution} = \text{HI titer.}$$

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Preparation of the different vaccines tested*

#### *Aqueous vaccine prepared with live concentrated FPV multiplied in HeLa cells*

He La cells previously incubated in hexagonal Pyrex flasks were infected with the 9th passage of the virus in these cells. The virus was mixed with the maintenance medium in an one-to-ten proportion and the whole added to the flasks. The medium was collected after total destruction of the cells (48-60 hours later), being then frozen and thawed. Cells debris were removed by centrifugation at 1,000-2,000 r/m for 5 minutes. This infected medium was centrifugated at 35,000 r/m for 30 minutes in Spinco model. The pellet was resuspended in a small

quantity of nutrient medium. This suspension was stored at 4 °C until utilization.

*Aqueous vaccine prepared with live FPV virus  
grown in HeLa cells*

For vaccination purposes we have utilized the infected medium obtained as explained before, except for its concentration.

*Oleous vaccine prepared with live concentrated  
FPV multiplied in HeLa cells*

The same procedure has been followed as for preparation of the aqueous vaccine. After concentration at 35,000 r/m and re-suspension in nutrient medium was performed, a fifty—fifty mixture of this re-suspension was made with Arlacel and Bayol F (Atlas Chemical Industries, Wilmington, Del., USA) mixed in an one-to-ten proportion. The whole was homogenized in M. S. E. homogenizer during 5 minutes. The vaccine is stored at 4 °C until utilization.

*Aqueous vaccine prepared with FPV virus multiplied  
in chick embryo cells inactivated by formaldehyde*

Primary culture of chick embryo cells, which had been incubated in Roux flasks, was infected with the 13th passage of FPV in these cells.

The virus was mixed to the maintenance medium in a 1/10 proportion and the whole added to the Roux. 24 hours later the medium was removed, frozen and thawed. Cell debris were removed by centrifugation at 2,000 r/m for 5 minutes.

Its HA titer was 640 and its lethal power for chickens (CLD) was  $10^4$  CLD in 1 ml. This infected medium was centrifugated at 35,000 r/m for 30 minutes. The sediment was re-suspended in nutrient medium (1/10 with respect of the original one). Its HA titer was 162,240 and its lethal power was  $10^{6.2}$  CLD 50 in 1 ml. A suspension of this material was made in normal saline until reaching an infective dose of  $10^4$  CLD 50 in 1 ml of the suspension. Formaldehyde at 35 per cent is added to this suspension until final dilution at 1/4,000.

It is placed in incubator at 37 °C for 3 days. After this time, the formaldehyde was inactivated with sodium bisulphite and adjusted

with sodium bicarbonate to pH = 7. The HA titer remained invariable during the whole inactivation.

*Aqueous vaccine prepared with FPV multiplied in chick embryo cells, inactivated by BPL*

We have utilized the infected medium and concentrated virus obtained in the vaccine prepared for inactivation by formaldehyde. After the concentration and suspension of the virus, we have added BPL (Fluka A. G., Switzerland) at  $10^{-2}$  in saline solution until reaching a final dilution of 1/3,000. This suspension was placed on a magnetic agitator during 2 hours at 37 °C and kept at 4 °C until utilization.

*Potency tests.* We have followed the method described hereafter, for each of the three vaccines prepared with live FPV multiplied in HeLa cells and for the vaccines prepared with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by formaldehyde:

Three groups have been made of 20 six-week-old leghorn chickens born in the laboratory incubators. A vaccine dose of 1 ml was given by intramuscular injection to the chickens of the first and second groups. The third group was not inoculated, in order that it serve as a control. Twenty days later, blood samples were taken for HI tests from all three groups; the inoculation was immediately repeated to the second group. Twenty days after this second inoculation, blood was taken for HI tests from chickens of the three groups. A subsequent challenge dose of  $10^4$  CLD 50 in 1 ml of infective allantoic fluid was also administered by the intramuscular route.

*Vaccine prepared with concentrate FPV in chick embryo cells inactivated by BPL plus oleous adjuvants*

Primary culture of chick embryo cells which had been cultivated in Roux flasks was infected with the 29th passage of FPV in these cells. The virus was mixed with the maintenance medium in an one-to-ten proportion and the whole added to the Roux. After total destruction of the cells (48 hours later), the medium was taken, being afterward frozen and thawed.

Cell debris were removed by centrifugation at 2000 r/m for 5 minutes. This infected medium was centrifuged at 25,000 r/m for 30 minutes. The pellet was re-suspended in maintenance medium in a 1/10

proportion with respect to the original suspension. BPL ( $10^{-2}$  in saline solution) was added until reaching a final dilution of 1/3,000.

This suspension was placed on a magnetic agitator during 2 hours at 37 °C. After agitation and treatment by BPL, the suspension was mixed in equal parts with a mixture of Arlachel A and Bayol F in a 1/10 proportion. This mixture was homogenized in M. S. E. homogenizer during 5 minutes and stored at 4 °C until utilization.

Samples were taken at different levels of the operation for hemagglutination and infective power tests.

*Vaccine prepared with unconcentrated FPV in chick-embryo cells inactivated by BPL plus oleous coadjuvants*

Primary culture of chick-embryo cells in Roux flasks infected with the 29th passage of FPV in these cells. The virus was mixed with the maintenance medium in the above-mentioned proportion. After total destruction of the cells, 48 hours later, the medium was collected and subsequently frozen and thawed. Cell debris were removed by centrifugation at 2,000 r/m for 5 minutes. Immediately, BPL ( $10^{-2}$  in saline solution) was added until final dilution at 1/3,000. Agitation treatment with Arlachel and Bayol and homogenization as mentioned above. Storage at 4 °C until utilization. Samples were taken at different levels for hemagglutination and lethal power tests.

Infectivity tests after treatment by BPL or formaldehyde:

Infectivity tests were carried out by inoculating 11-days-old embryonated eggs with 0.1 ml of every kind of vaccines inactivated by BPL or formaldehyde.

The inoculated eggs were observed until birth of the chick.

*Potency tests of the vaccines prepared with concentrated and unconcentrated FPV in chick-embryo cells inactivated by BPL plus oleous coadjuvants*

For every one of these vaccines, we have made six groups of six-weeks old Leghorn chickens born in the laboratory incubators. Every group was vaccinated and challenged intramuscularly.

The first group received a single 0.5 ml dose.

The second group received a 0.5 ml dose and was re-vaccinated with 0.5 ml a month later.

The third group received a single 1 ml dose.

The fourth group received a 1 ml dose and was re-vaccinated a month later with 0.5 ml.

The fifth group received a 1 ml dose and was re-vaccinated a month later with 1 ml.

A group of non-vaccinated 80 chickens of the same age has served as a control of the activity of the challenge virus.

Each group has been challenged, in subgroups of 10 chickens, 1,2,3,4, 5,6,8 and 12 months after the first inoculation of the vaccine.

*Potency test of the unconcentrated FPV oleous vaccine inactivated by BPL*

In order to determine the immunizing potency and the stability of the physical characteristics of the oleous vaccine, we have kept it in flame sealed ampoules in samples of 1 ml and in glass flasks of 100 to 250 ml sealed with rubber.

For vaccination purposes we have only utilized the ampoules.

## RESULTS

*Aqueous vaccine prepared with live concentrated FPV in HeLa cells*

Potency tests showed no appreciable protection (see *Table 1*) in vaccinated chickens. In several tests the HI reached more high titers (up to 160), but the mortality was of a hundred per cent.

*Aqueous vaccine prepared with live unconcentrated FPV multiplied in HeLa cells*

As in the above vaccine, the results are not satisfactory and indicate a minimum protection (see *Table 2*).

*Oleous vaccine prepared with live concentrated FPV multiplied in HeLa cells*

The results of the potency tests show (see *Table 3*) a protection of 40 per cent in vaccinated and re-vaccinated chickens twenty days after re-vaccination. In several other tests in the same way, the HI titer is slightly higher but survival never exceeds 40 per cent.

*Aqueous vaccines prepared with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by formaldehyde*

Results obtained with this vaccine are shown in *Table 4*. The protection is of 40 per cent. HI titers are very similar to the ones obtained with vaccines proceeding from HeLa cells.

*Aqueous vaccine prepared with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by BPL*

This is the aqueous vaccine which has given the highest HI titers and the greatest survival in vaccinated and re-vaccinated birds (see *Table 5*).

*Oleous vaccine prepared with concentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL*

The results of potency tests are shown in *Table 6*. They demonstrate a high protective power in vaccinated birds. Mortality is only of 10 per cent in the challenge made six months after vaccination in vaccinated birds with a single dose of 0.5 ml. The protection shown in the challenge made in the eighth month is satisfactory. It is absolute in groups vaccinated with 1 ml and re-vaccinated with 0.5 ml or 1 ml. In the challenge made a year after vaccination, a survival of 70 per cent is reached in those groups and in groups vaccinated and re-vaccinated with 0.5 ml.

HI titers are very high, even eighth months after vaccination, except in groups vaccinated with a single dose of 0.5 ml or 1 ml.

*Oleous vaccine prepared with unconcentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL*

The first cases of mortality produced by the challenge virus occur five months after vaccination in the group vaccinated with a single dose of 0.5 ml (see *Table 7*). In the challenge made after six months, the protection is of 80 and 90 per cent, respectively, in groups vaccinated with a single dose of 0.5 ml or 1 ml. In other groups the protection is of a 100 per cent. In the challenge made after eight months, the protection is still of a 100 per cent in vaccinated groups with 1 ml and re-vaccinated with 0.5 ml or 1 ml. A year after vaccination, the mortality is bet-

*Table 1. Potency test of the aqueous vaccine prepared with live concentrated FPV multiplied in HeLa cells*

Dose of vaccine	Twenty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Twenty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		No vaccinated birds (Control)	
	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )						
Twenty days after first inoculation		20		20		0
Forty days after first inoculation	90	20				0
Twenty days after second inoculation			80	40	100	0

HI = Hemagglutination inhibition titer of the pool of the sera before challenge.

Table 2. Potency tests of the aqueous vaccine prepared with live FPV grown in HeLa cells

Dose of vaccine	Twenty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Twenty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		No vaccinated birds (Control)	
	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )						
Twenty days after first inoculation		10		10		0
Forty days after first inoculation	100	20				0
Twenty days after second inoculation			90	20	100	0

*Table 3. Potency tests of the oleous vaccine prepared with live concentrated FPV multiplied in HeLa cells*

Dose of vaccine	Twenty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Twenty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		No vaccinated birds (Control)		
	Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
Twenty days after first inoculation			20		20		0
Forty days after first inoculation		80	40				0
Twenty days after second inoculation				60	80	100	0

Table 4. Potency test of the aqueous vaccine prepared with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by formaldehyde

Dose of vaccine	Twenty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Twenty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		No vaccinated birds (Control)	
	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )						
Twenty days after first inoculation	20	20		20		0
Forty days after first inoculation	100	20				0
Twenty days after second inoculation			60	80	100	0

*Table 5. Potency test of the aqueous vaccine prepared with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by BPL*

Dose of vaccine	Twenty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Twenty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		No vaccinated birds (Control)		
	Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
Twenty days after first inoculation		20	20		20		0
Forty days after first inoculation		100	20				0
Twenty days after second inoculation				40	160	100	0

Killed fowl plague virus vaccine

ween a 100 per cent in groups vaccinated with a single 0.5 ml dose and 30 per cent in groups vaccinated and re-vaccinated with 1 ml.

HI titers are very high even eight months after vaccination, except in groups vaccinated with a single dose.

*Oleous vaccine prepared with unconcentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL, kept at 6 °C during a year*

The results of the potency test of this vaccine are shown in *Table 8*. Survival is of 100 per cent in all groups challenged four months after vaccination.

On the eight month, protection is of 100 per cent in all groups, except in groups vaccinated with a single 0.5 ml dose. In these groups, survival is of 90 per cent.

A year after vaccination, the challenge produces a mortality between 100 and 30 per cent accordingly to the different groups.

HI titers are very high, even six months after vaccination.

*Results of the stability of physical characteristics of the oleous vaccine kept for a year at 4 °C*

When oleous vaccine was maintained in flame-sealed tubes in samples of 1 ml, there was no alteration of its physical characteristics. When kept in greater amounts (100 ml to 250 ml), a thin aqueous layer detaches itself on the surface of the homogenized about the third month. When agitated again, the layer recovers its primitive aspect.

## DISCUSSION

The immunizing possibilities of either oleous and aqueous vaccines prepared with live virus multiplied in HeLa cells can be considered as scarce or null. The tests made in order to determine the possibility of an immunizing power of FPV grown in HeLa cells were carried out, even consciously of the danger represented by any vaccine prepared in cancerous cells. This fact is confirmed by the report of the Committee on Tissue Culture Viruses and Vaccines. These tests mean only an investigation of the biological characteristics of the vaccines.

Table 6. Potency tests of the vaccine with concentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL plus Arlcel and Bayol as oleous coadjuvants (\*)

Dose of vaccine	Eighty vaccinated birds with a single dose of 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 0,5 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		
	Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
after											
1 month		0	320		320	0	1,280		1,280		1,280
2 months		0	1,280	0	2,560	0	5,120	0	5,120	0	5,120
3 months		0	1,280	0	5,120	0	5,120	0	5,120	0	10,240
4 months		0	640	0	5,120	0	2,560	0	5,120	0	10,240
5 months		0	320	0	1,280	0	1,280	0	2,560	0	5,120
6 months		10	160	0	640	0	640	0	1,280	0	2,560
8 months		20	40	10	160	20	80	0	640	0	640
12 months		100	0	30	80	20	30	30	80	30	80

(\*) In all the tests the mortality of control unvaccinated birds was of 100 per cent.

Table 7. Potency tests of the vaccine with unconcentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL plus Arlcel and Bayol as oleous coadjuvants (\*)

Dose of vaccine	Eighty vaccinated birds with a single dose of 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 0,5 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		
	Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
after											
1 month		0	640		640	0	2,560		2,560	0	2,560
2 months		0	640	0	2,560	0	5,120	0	5,120	0	5,120
3 months		0	1,280	0	2,560	0	2,560	0	5,120	0	10,240
4 months		0	640	0	2,560	0	1,280	0	5,120	0	10,240
5 months		10	160	0	1,280	0	160	0	2,560	0	10,240
6 months		20	160	0	320	10	160	0	1,280	0	2,560
8 months		40	80	10	160	30	80	0	640	0	640
12 months		100	0	20	80	50	40	50	20	30	80

(\*) In all the tests the mortality of control unvaccinated birds was of 100 per cent.

*Table 8. Potency tests of the vaccine with unconcentrated FPV in chick embryo cells inactivated by BPL plus Arlacel and Bayol as oleous coadjuvants (Vaccine kept during a year at +4 °C) (\*)*

Dose of vaccine	Eighty vaccinated birds with a single dose of 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 0,5 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with a single dose of 1 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 0,5 ml		Eighty vaccinated birds with 1 ml revaccinated with 1 ml		
	Challenge (10.000 CLD <sub>50</sub> )	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI	Mortality per cent due to challenge	HI
after											
1 month	0	320		320	0	1,280		1,280	0	1,280	
2 months	0	640	0	1,280	0	2,560	0	5,120	0	5,120	
3 months	0	1,280	0	2,560	0	2,560	0	5,120	0	10,240	
4 months	0	640	0	2,560	0	1,280	0	2,560	0	10,240	
5 months	10	160	0	1,280	0	160	0	2,560	0	5,120	
6 months	20	80	10	160	10	80	0	1,280	0	2,560	
8 months	40	40	20	80	40	40	10	160	10	160	
12 months	100	0	40	40	80	0	40	40	30	80	

(\*) In all the tests the of control unvaccinated birds was of 100 per cent.

Results obtained in potency tests of the aqueous vaccine with FPV multiplied in chick embryo cells inactivated by formaldehyde show an effective protection in some cases and prolongation of life in most frequent occasions.

In the course of inactivation tests of the virus by BPL, we have noted that the hemagglutinant capacity remains unchanged (see *Table 9*).

In all infectivity tests after treatment by BPL, the virus was found to be absolutely inactivated, as no death occurred in any of the eggs inoculated with the infective inactivated material; however, it has been necessary to perform several times the inactivation by formaldehyde of the infective material, until reaching the negativity of infectiveness tests.

The results obtained with FPV multiplied in chick embryo cells and inactivated with BPL and oleous adjuvants are very satisfactory.

In potency tests carried out with concentrated and unconcentrated vaccines, we have noted that there is not a sensible difference between

*Table 9. Biological characteristics of FPV multiplied in chick embryo cells 30th passage after concentration treatment with BPL*

	FPV 30th passage no concentrated	FPV concentrated	FPV no concentrated treated with BPL	FPV concentrated treated with BPL
HA titer	640	10,240	640	10,240
Lethal power for chick embryo (ELD <sub>50</sub> ) 0.1 ml	10 <sup>4.4</sup>	10 <sup>6.5</sup>	0	0
Lethal power for chick (CLD <sub>50</sub> ) 1 ml	10 <sup>4.2</sup>	10 <sup>6</sup>	0	0

the results obtained with both vaccines, regarding not only the survival percentage but also the HI titers obtained. This fact indicated that it is not necessary to previously concentrate the virus. Very similar results have been achieved with FPV vaccine stocked during a year at 4 °C; they indicate a great stability of the so prepared vaccine (see *Table 10*).

These facts lead to the belief that these vaccines obtained on cellular culture should result more economic than the ones obtained on embryonated eggs.

Table 10. Comparative study of the HI titers reached after vaccination (single or double) with concentrated, unconcentrated and stocked FPV oleous vaccines inactivated by BPL

HI titers	Concentrated FPV vaccine		Unconcentrated FPV vaccine		Stocked FPV vaccine a year at 4 °C	
	Higher	Lower	Higher	Lower	Higher	Lower
1 month	1,280	320	2,560	640	1,280	320
2 months	5,120	1,280	5,120	640	5,120	640
3 months	10,240	1,280	10,240	1,280	10,240	1,280
4 months	10,240	640	10,240	640	10,240	640
5 months	5,120	320	10,240	160	5,120	160
6 months	2,560	160	2,560	160	2,560	80
8 months	640	40	640	80	160	40
12 months	80	0	80	20	80	0

A direct relation has been found between HI titer and per cent mortality after challenge in birds vaccinated with concentrated, unconcentrated and stocked FPV oleous vaccine, as shown in *Table 11*. A HI titer of 160 corresponds to 0-10 per cent of deaths in the fifth month after vaccination. The maximum percentage of deaths (80-100 per cent) corresponds to the HI titer = 0, twelve months after vaccination.

Comparing the result obtained in each group of birds vaccinated with oleous vaccines, it is ascertained that a better protection is obtained with a 0.5 ml dose of vaccine and re-vaccinating a month later, than with a single vaccination of 1 ml. In birds vaccinated with 1 ml, a rapid increase of the HI titer is noted; this titer decreases more slowly in birds vaccinated and re-vaccinated with 0.5 ml than in the ones vaccinated with a single 1 ml dose. The mortality due to challenge appears simultaneously in birds vaccinated with a single 1 ml dose and in birds vaccinated (0.5 ml) and revaccinated (0.5 ml); however, in the second case survival to challenge after 12 months is double than the obtained

with a single 1 ml. The best results are obtained with a 1 ml dose followed one month later by a revaccination with 1 ml. This furnishes a protection of 100 per cent to challenge eight months after vaccination, and of 70 per cent twelve months after vaccination. It is possible that a re-vaccination with 1 ml five months after vaccination with the same dose causes 100 per cent protection during a year at least.

*Table 11. Relation between HI titer and mortality per cent after challenge (10,000 CLD<sub>50</sub>) in vaccinated chick with concentrated, unconcentrated and stocked FPV oleous vaccines inactivated by BPL*

Challenge	HI titer				
	160	80	40	20	0
5 months	0-10	X (*)	X	X	X
6 months	0-20	10-20	X	X	X
8 months	10-20	20-40	20-40	X	X
12 months	X	20-40	50-70	50-80	80-100

after vaccination

(\*) X = This titer is not present in the related month.

It is considered very important to keep at low temperatures (on ice) the mixture of inactivated infected medium and adjuvants during homogenization in M. S. E., in order to obtain better results as regards protection.

We have considered that the homogenization of the mixture of aqueous infective material with oleous adjuvants is perfect when, adding a drop of the homogenized on water, the former does not diffuse itself. This result is obtained at the end of 5-7 minutes of rapid agitation in the homogenizer.

Because of the oleous consistence of these vaccines, it is necessary to use thick needles for the intramuscular inoculation in birds.

No irritative or intolerance lesion, caused by adjuvants, has been observed in the hundreds of birds vaccinated.

## SUMMARY

A killed vaccine against fowl plague is prepared after several passages of fowl plague virus, Rostock strain in chick embryo cells. The infected medium is inactivated by  $\beta$ -propiolactone. The use of both Arlcel and Bayol produces very high protector levels. This vaccine was experimented on 2 to 3 months old chickens which were afterwards challenged with 10,000 LD<sub>50</sub> of the live virus with several delays. The survival in challenged birds is of 100 per cent for 6 months after vaccination and 70 per cent for a year. A direct relation has been found between hemagglutination inhibition titer and 100 per cent mortality.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We express our gratitude to Miss Luisa Rodríguez for valuable technical assistance.

## RESUMEN

Se ha obtenido una vacuna contra la peste aviar clásica después de haber efectuado varios pases del virus (Fowl plague virus, cepa Rostock) sobre fibroblastos de embrión de pollo. El medio de cultivo de las células infectadas ha sido inactivado por  $\beta$ -propiolactone a 37 °C. La utilización de Arlcel y Bayol ha dado lugar a un alto poder protector. La vacuna ha sido ensayada en pollos de 2-3 meses que fueron posteriormente inoculados en plazos variables con 10.000 DL<sub>50</sub> de virus vivo. La protección es del 100 por ciento en los seis meses siguientes a la vacunación y del 70 por ciento un año después. Estos resultados son paralelos a la aparición de altos títulos inhibidores de la hemaglutinación en el suero de los animales vacunados.

## BIBLIOGRAPHY

1. BALDUCCI, D. 1955. Riv. Ist. Sieroterap. Ital., 30, 71.
2. BANKOWSKI, R. A. 1958. Avian Diseases, 2, 197.
3. BANKOWSKI, R. A.; CORSTVET, R., and FABRICANT, J. 1958. Avian Diseases, 3, 227.

4. BANKOWSKI, R. A.; CORSTVET, A., and FABRICANT, J. 1958. *Avian Diseases*, 3, 466.
5. HARTMAN, F. W., and KELLY, A. A. 1953. *Federation Proc.*, 12, 390.
6. HARTMAN, F. W.; LO GRIPPO, G. A., and KELLY, A. R. 1956. *Federation Proc.*, 15, 518.
7. HARTMAN, F. W.; PIEPES, S. L., and WALLBANK, A. M. 1951. *Federation Proc.*, 10, 358.
8. HUYGELEN, C., and PEETERMANS, J. 1963. *Res. Vet. Sci.*, 4, 294.
9. JACOTOT, H. 1962. *Rev. Immunol.*, 23, 111.
10. LO GRIPPO, G. A., and HARTMAN, F. W. 1954. *Federation Proc.*, 13, 503.
11. LO GRIPPO, G. A., and HARTMAN, F. W. 1955. *J. Immunol.*, 75, 123.
12. LO GRIPPO, G. A.; OVERHULSE, P. R., and SZILAGYI, D. E. 1954. *Bacteriol. Proc. (Soc. Am. Bacteriologists)*, 61, 62.
13. RAMON, G. 1957. *Quarante années de recherches et de travaux*, 269.
14. RONDA, E.; GARCÍA-GANCEDO, A.; ALONSO, M. L.; VILAS, P., and GALLARDO, E. (†). 1965. *Microbiol. Españ.*, 13, 175.
15. SALK, J. E. 1953. *J. Am. Med. Assoc.*, 151, 1.169.
16. SALK, J. E.; BAILEY, M. L., and LAURENT, A. M. 1952. *Am. J. Hyg.*, 55, 439.
17. SALK, J. E.; LAURENT, A. M., and BAILEY, M. L. 1951. *Am. J. Public. Health*, 41, 669.

LABORATORIOS ALTER  
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION  
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA

## VALORACION DE NEOMICINA CON *BACILLUS LICHENIFORMIS*

por

F. FERNANDEZ

### INTRODUCCION

Existen diversos procedimientos para la valoración microbiológica de la neomicina. Entre dichos métodos, unos son por difusión sobre agar en placa y otros por turbidez. Para el trabajo rutinario en nuestro laboratorio, tenemos preferencia por los métodos en placa grande y procuramos en lo posible prescindir de gérmenes patógenos.

Al emplear la técnica que describe la Farmacopea Británica (1) utilizando *Bacillus pumilus* NCTC 8.241, tropezamos con el inconveniente de que se obtenían unas inclinaciones muy pequeñas para las curvas patrón y problema; esto traía consigo el trabajar con unos límites de error excesivamente amplios, que frecuentemente excedían a los prescritos por la Farmacopea.

En un trabajo anterior (3) estudiamos la valoración de estreptomina y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter y posteriormente probamos a valorar la neomicina utilizando el mismo germen de ensayo.

### MATERIAL Y METODOS

Los detalles técnicos para la valoración son los mismos que describimos anteriormente para la estreptomina en lo que se refiere a la preparación de la suspensión de esporas, placas de ensayo, etc. El me-

dio de ensayo es el mismo que recomienda la Farmacopea Británica para la valoración de neomicina y se utiliza en una sola capa. La cantidad de suspensión de esporas que hay que añadir al medio se averigua la primera vez mediante tanteo y esto sirve de orientación para veces sucesivas. El tampón utilizado para efectuar las diluciones fue también el de fosfatos de pH 7,9-8,0.

Para la curva patrón se usaron cinco concentraciones diferentes, en progresión geométrica, lo cual, como sabemos, nos permite el empleo de coeficientes polinominales u ortogonales en el cálculo estadístico. En este caso, la relación entre las concentraciones fue de 1,55, siendo la más pequeña de  $3,465 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  y la mayor de  $20,0 \mu\text{g}/\text{cm}^3$  (en base).

El diseño utilizado para distribuir las distintas concentraciones fue en forma de cuadrado latino con cinco lecturas para cada concentración.

Antes de incubar las placas se tuvieron dos horas a la temperatura de la habitación. La temperatura de incubación es de  $32^\circ\text{C}$  durante un período de alrededor de dieciocho horas.

El crecimiento del germen en las placas fue homogéneo y los halos de inhibición que se obtuvieron resultaron nítidos y de borde bien definido.

Las lecturas se efectuaron con un calibrador apropiado, obteniéndose en milímetros y décimas de milímetro.

La bibliografía general para este tipo de ensayos puede encontrarse en el trabajo a que aludimos anteriormente (3).

## RESULTADOS Y DISCUSION

En el *cuadro 1* pueden verse los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones. Para el cálculo estadístico se emplean los coeficientes polinomiales en vez de los logaritmos de las concentraciones.

Cuadro 1

Concentraciones, $\mu\text{g}/\text{cm}^3$	3,465	5,371	8,325	12,903	20,000
Logaritmos de las concentraciones	0,53971	0,73004	0,92037	1,11070	1,30103
Coefficientes polinomiales, X	- 2	- 1	0	+ 1	+ 2
Resultados en milímetros, Y	17,3	18,1	19,4	20,1	20,8
	17,6	18,2	19,2	19,9	20,6
	17,7	18,5	19,0	20,0	20,7
	17,7	18,3	19,3	19,9	20,6
	17,4	18,4	19,1	20,2	20,8
Totales, T	87,7	91,5	96,0	100,1	103,5
Medias, Z	17,54	18,30	19,20	20,02	20,70

Para el estudio estadístico de los resultados, empleamos las mismas fórmulas y procedimientos que en trabajos anteriores (2-3).

*Cálculo de la línea de regresión*

Como ya conocemos, en este caso particular el coeficiente de regresión viene dado por la fórmula

$$b = \frac{S(XZ)}{S(X^2)}$$

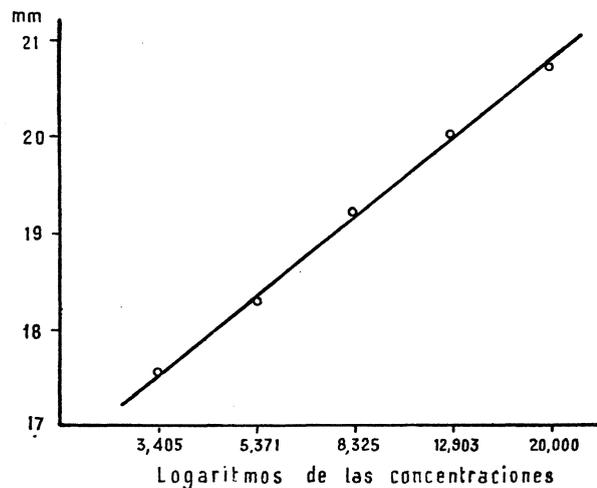
El valor calculado para b es de 0,804. Esto quiere decir que la ecuación para la línea de regresión será

$$Z = \bar{Z} + 0,804 X$$

o sea

$$Z = 19,152 + 0,804 X$$

En la *figura 1* puede verse la línea de regresión correspondiente a la ecuación anterior.



*Figura 1. Valores obtenidos experimentalmente y línea de regresión calculada según se describe en el texto*

#### Análisis de varianza

En el *cuadro 2* se pueden ver los resultados del análisis de varianza, efectuado teniendo en cuenta las fuentes de variación que se reseñan.

*Cuadro 2*

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Varianza	Razón de la varianza (F)	
				Calculada	P = 0,95
Total	32,8234	24			
Entre concentraciones	32,3834	4	8,0958		
Regresión	32,3208	1	32,3208	146,914	4,35
Desviación de la linealidad	0,0626	3	0,0208	0,945	3,10
Error experimental	0,4400	20	0,0220		

Como se ve, la regresión es significativa, ya que el valor calculado para F es bastante mayor que el valor correspondiente en las tablas estadísticas para valores de F. Por otro lado, no hay desviación significativa en la linealidad, ya que el valor de F obtenido es menor que el correspondiente de la tabla; como puede observarse, el valor obtenido en este caso es menor que la unidad y como los valores de F inferiores a la unidad no se encuentran en las tablas, tomamos el valor inverso, que es 1,057, al que corresponde un valor tabulado de 5,70. Esto quiere decir que aunque las variaciones alrededor de la línea de regresión son algo más pequeñas de lo que podría esperarse del grado de variación encontrado dentro de las concentraciones (error experimental), no lo son tanto que deban atribuirse a defecto en la técnica del ensayo.

#### *Comentario final*

Para las valoraciones rutinarias y al igual que en el caso de la estreptomycinina utilizamos un ensayo del tipo  $2 \times 2$ . En este caso empleamos las concentraciones de 4 y 20  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . En cada placa pueden incluirse varios problemas que se comparan simultáneamente con el mismo patrón. Para el cálculo de la potencia, prueba de paralelismo y obtención de los límites de error seguimos las fórmulas e indicaciones de la Farmacopea Británica.

Cuando interese una sensibilidad mayor en la valoración, puede recurrirse a retardar la incubación de las placas manteniéndolas previamente varias horas en nevera. Con cinco horas se consiguen lecturas del orden de 16 mm aproximadamente para la concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ . En este caso pueden emplearse las concentraciones de 1 y 4  $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ , con lo que la sensibilidad del ensayo se aumenta notablemente. Entre 1 y 4  $\mu\text{g}$  también se ha demostrado que existe una relación lineal entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas.

#### CONCLUSIONES

A la vista de lo anteriormente expuesto se deduce que puede valorarse la neomicina con el *Bacillus licheniformis* Alter ya que:

- 1) El crecimiento del germen en las placas es perfectamente homogéneo.

2) Los halos de inhibición que se producen son nítidos, de borde bien definido y de tamaño apropiado.

3) La relación entre los logaritmos de las concentraciones y las respuestas es lineal, dentro de límites convenientes.

#### RECONOCIMIENTO

Mi agradecimiento, en primer lugar, a la Dirección Técnica de Alter, S. A., por las facilidades dadas y al Prof. Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, por la buena acogida dispensada para la publicación de este trabajo. Agradezco también la colaboración entusiasta de la Srta. Blanca Santos Corral, a cuyo cargo corrió la parte práctica de las experiencias realizadas.

#### RESUMEN

Se estudia la valoración de neomicina con el *Bacillus licheniformis* Alter. Se analiza estadísticamente la línea logarítmica concentraciones-respuestas, incluyendo el cálculo de la regresión y el análisis de varianza de los resultados obtenidos.

#### SUMMARY

The assay of neomycin with *Bacillus licheniformis* Alter is studied. Statistical analysis is made from the results obtained, including the regression calculation and the variance analysis.

#### BIBLIOGRAFIA

1. British Pharmacopoeia. 1963.
2. FERNÁNDEZ, F. 1963. Valoración de formaldehído en placa de agar. Comunicaciones libres y a las ponencias de la II Convención Bienal de la Industria Farmacéutica Nacional, 140.
3. FERNÁNDEZ, F. 1964. Valoración de estreptomycin y derivados con *Bacillus licheniformis* Alter. Microbiol. Españ., 17, 209.

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

## ANTIBIOTICORRESISTENCIA *IN VITRO* DE ESTAFILOCOCOS TRATADOS POR ASOCIACIONES DE PENICILINA CON NEOMICINA, NOVOBIOCINA Y KANAMICINA

por

M.<sup>a</sup> TERESA PEREZ-UREÑA

### INTRODUCCION

Desde que Kronig y Paul (10), a fines del pasado siglo, fijaron los fundamentos químicos para el estudio de la desinfección, hasta el momento actual, en que el empleo terapéutico de las asociaciones antibióticas en Clínica es una constante realidad, son muchos los jalones marcados en los prometedores senderos de la Quimioterapia. Por otra parte, también es posible afirmar que todos los éxitos de las nuevas drogas siempre estuvieron acompañados por la aparición de otras estirpes bacterianas con más acusada quimiorresistencia; la necesidad de combatirlas, multiplica el número de estudios y experiencias, que aparecen orientados principalmente en tres direcciones: investigación de nuevas drogas, combinación de las más acreditadas clínicamente y asociación de Antibioterapia e Inmunoterapia.

La consulta de trabajos de diferentes autores (2, 4-5, 8, 11, 13 y 16) muestra que la antibioterapia combinada tiene indicaciones y contraindicaciones; por ello, es importante conocer bien sus características para no hacer un uso indiscriminado de la misma. Entonces, mirando hacia ese interrogante de si debe o no emplearse una asociación antibiótica, pensamos que —a nuestro juicio— antes de que una categórica contestación sea dada, nuevos datos habrán de buscarse, y no sólo en relación

con sus posibilidades de sinergismos o antagonismos, sino también en cuanto a sus consecuencias microbiológicas de aparición de antibiotico-resistencia y sobre todo de resistencias cruzadas o múltiples.

Entre los muchos trabajos referentes al empleo de asociaciones anti-bióticas, existe tan sólo una mínima proporción de publicaciones que se ocupen de la antibiotico-resistencia resultante y sus conclusiones no siempre coinciden. Mientras Hsie y Bryson (61) y Jann y colaboradores (7) observan fenómenos de doble resistencia consecutivos al empleo de dos drogas entre las que no existen resistencias cruzadas, Wright y colaboradores (18) sostienen que las asociaciones antibióticas retrasan o suprimen la aparición de la resistencia; asimismo es posible encontrar resultados variables (3, 9, 12-13, 15 y 19). En cuanto a la aparición de resistencias cruzadas, en casos semejantes, Barber y colaboradores (1), parecen señalarlas entre cloranfenicol y eritromicina, cuando se asocian estos dos antibióticos.

Prescindiendo de detalles técnicos y de circunstancias en relación con la especie bacteriana y naturaleza de la droga, pensamos que la variabilidad de resultados dependerá en gran parte del tipo de interacción entre ambas sustancias. Así, hemos emprendido una serie de experiencias encaminadas a estudiar la influencia de las asociaciones antibióticas sobre la antibiotico-resistencia bacteriana, seleccionando, entre las muchas posibles, aquellas de las que no existían antecedentes en relación con el tema que nos ocupa. De ellas, presentamos en esta publicación los resultados obtenidos con tres asociaciones de marcado efecto sinérgico (penicilina + neomicina, novobiocina o kanamicina) frente a estafilococos que alcanzan su antibiotico-resistencia por adaptación *in vitro*.

## MATERIAL Y METODOS

Las *cepas bacterianas* utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* hemolíticos y coagulopositivos, aislados de distintos procesos infecciosos en los que hubo intervención de antibioterapia. Por ello, estas cepas se incorporaron a la colección y de ellas se hicieron tres o cuatro resiembras sobre agar común inclinado, para estabilizar sus características, antes de utilizarlas en este estudio.

Los *antibióticos* empleados fueron: oleandomicina, cloranfenicol, tetraciclina, clorotetraciclina, oxitetraciclina, colimicina, paromomicina, kanamicina, ristocetina, polimixina B, neomicina, novobiocina, eritromicina, estreptomycin y penicilina.

Con ellos se prepararon soluciones patrón, en agua destilada y a las concentraciones requeridas, para después diluir sobre los medios líquidos, obteniendo así el substrato antibiótico deseado o las series de diluciones para titulación. Las soluciones patrón de cada antibiótico, enseguida de preparadas, se esterilizaron por filtración a través de filtros EKA 6/L y fueron mantenidas en congelador a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  durante tiempos variables, siempre de acuerdo con sus características de conservación.

Con ellas se prepararon las series para determinación de concentración mínima inhibidora (C. M. I.) y se establecieron distintas asociaciones, de las que citaremos aquí tan sólo los datos correspondientes a penicilina + noviobicina, penicilina + neomicina y penicilina + kanamicina.

Los *medios de cultivo*, eran variables, según los propósitos de utilización: a) para conservación y estudios bacteriológicos de las cepas; b) para desarrollo de resistencias, y c) para determinación de las C. M. I. diagnósticos de las interacciones antibióticas y antibiogramas.

a) para conservación de las cepas, se utilizó agar-suero en tubo inclinado, y para los estudios bacteriológicos, placas de agar-sangre y agar de Chapman.

b) el desarrollo de la antibioticorresistencia, se efectuó sobre el siguiente medio, a pH 6.8:

Extracto de carne Difco, 3 g.  
Bacto-peptona Difco, 5 g.  
Autolisado de levadura Difco, 2 g.  
Agua destilada, c. s. p. 1.000 cm<sup>3</sup>.

c) para las determinaciones de C. M. I., y por tanto de los antibiogramas, utilizamos el medio que sigue, a pH 6.8:

Extracto de carne Difco, 1,5 g.  
Autolisado de levadura Difco, 1,5 g.  
Bacto-peptona Difco, 5,0 g.  
Glucosa, 1,0 g.

Cloruro sódico, 3,5 g.  
Fosfato dipotásico Merck, 3,68 g.  
Fosfato monopotásico Merck, 1,32 g.  
Agua destilada, c. s. p. 1.000 cm<sup>3</sup>.

Cuando la cantidad de antibiótico a añadir, podía influir en las condiciones nutritivas del medio por dilución excesiva de sus componentes, se preparaba un medio a doble concentración, a partir del cual, con la solución antibiótica patrón y agua destilada estéril, se formaba el medio normal con el antibiótico correspondiente a mayor concentración.

En cuanto a las *técnicas* utilizadas, fueron: para estudio de antibiogramas sobre medio líquido y determinación de C. M. I., las indicadas por Portolés (14) y para diagnóstico del comportamiento de las asociaciones, la recomendada por Welch (17).

Para desarrollo de resistencias por adaptación, se consideraron tres series, A, B y A + B, según que las drogas estén aisladas o asociadas. Para cada una de las tres series se usaron dos matraces de Erlenmeyer de 100 cm<sup>3</sup> de capacidad, con 20 cm<sup>3</sup> de caldo-levadura estéril, sobre los que se añadieron el antibiótico o antibióticos correspondientes, a concentraciones ligeramente inferiores a las C. M. I. previamente determinadas. En esta experiencia se mantienen los matraces a 37 °C durante cuarenta y ocho horas y en el intervalo de incubación, es decir, a las veinticuatro horas, se volvieron a determinar las C. M. I. en las tres series planteadas, para así, con los datos obtenidos, preparar los medios líquidos siguientes (que intervendrán veinticuatro horas más tarde) con las cantidades de antibiótico que corresponden a las variaciones en el nivel de atibioticorresistencia. Después de las cuarenta y ocho horas de crecimiento en estufa de 37 °C, se resiembró el germen en los nuevos medios antimicrobianos, siempre dentro de cada serie correspondiente. De este modo se controlaron las concentraciones antibióticas y se evitó que, por esas fluctuaciones que siempre puede haber, de descenso del nivel de la resistencia, se destruyeran los microorganismos y se pudiera perder alguna experiencia.

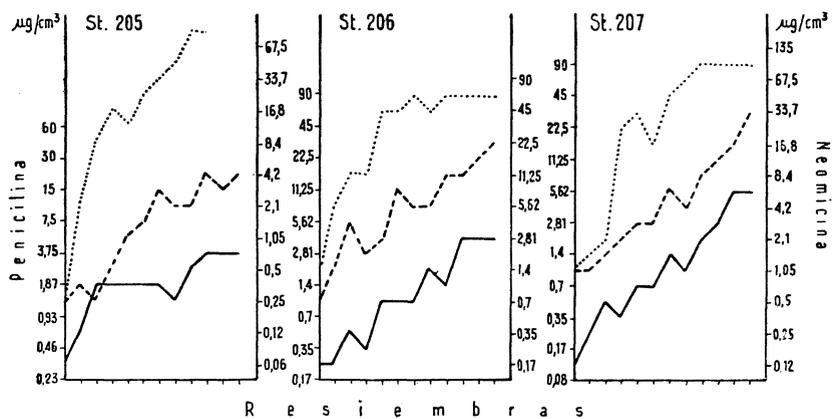


Figura 1

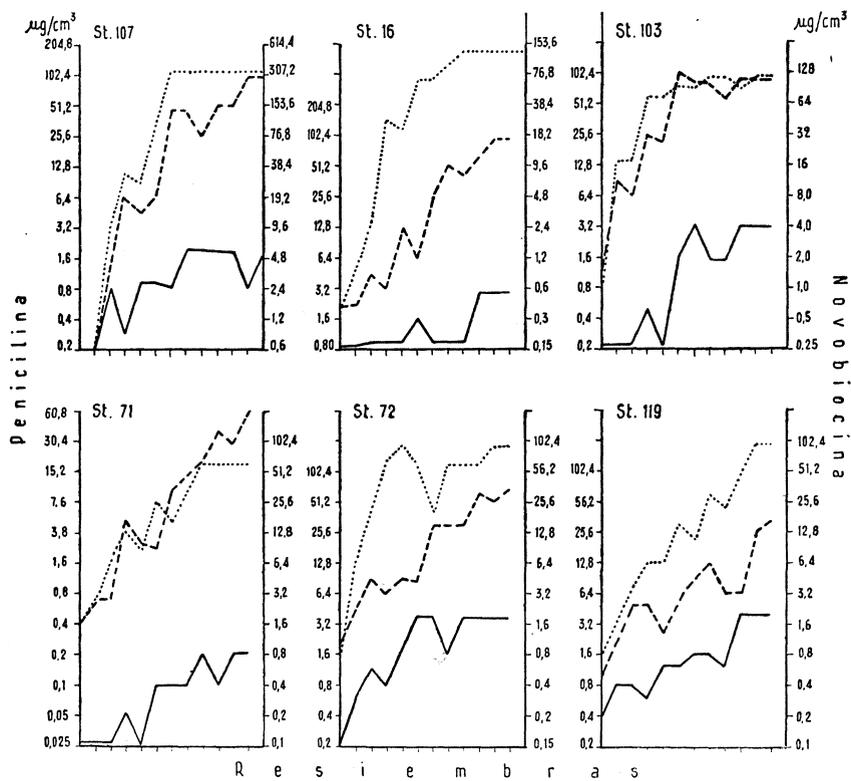


Figura 2

## RESULTADOS

En nuestra marcha de trabajo realizamos un estudio previo del espectro antibiótico de cada cepa para selección de asociaciones y diagnóstico de la interacción.

Con estos datos se iniciaron los ensayos de adaptación *in vitro* mediante doce resiembras con intervalos de cuarenta y ocho horas. Las figuras 1-3 indican, en representación semilogarítmica, las variaciones de C. M. I. para las distintas resiembras. En todas ellas, la línea de trazos corresponde al antibiótico A (indicado a la izquierda), la de puntos, al B (indicado a la derecha) y la de trazo continuo, a la asociación A + B.

Por otra parte, para cada grupo de experiencias se consideraron tres

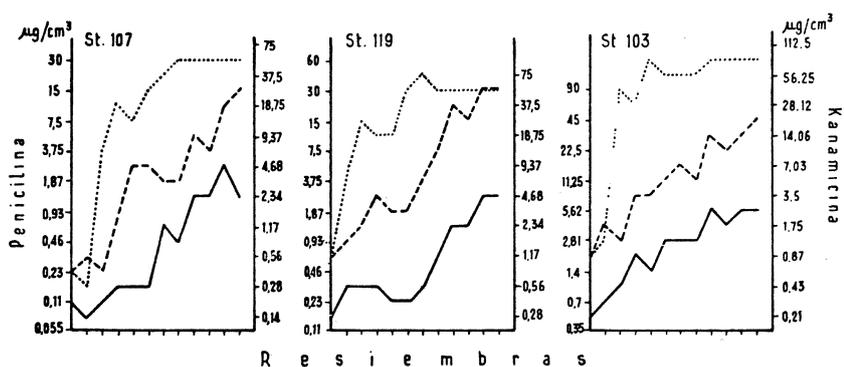


Figura 3

fases, inicial, media (a la 6.<sup>a</sup> resiembra) y final (a la 12.<sup>a</sup> resiembra) en las que fueron determinados los antibiogramas frente a los quince antibióticos distintos, para conocer las variaciones de los espectros antibióticos de acuerdo con el grado de resistencia.

Los resultados, que se presentan en las figuras 4-6 indican la aparición de resistencias cruzadas o múltiples y se expresan en disposición tridimensional, en la que las ordenadas representan logaritmos de C. M. I., mientras que los planos horizontales constan de tres columnas anteroposteriores correspondientes a cada antibiótico y a su asociación, que están cruzadas por quince planos transversales (uno para cada an-

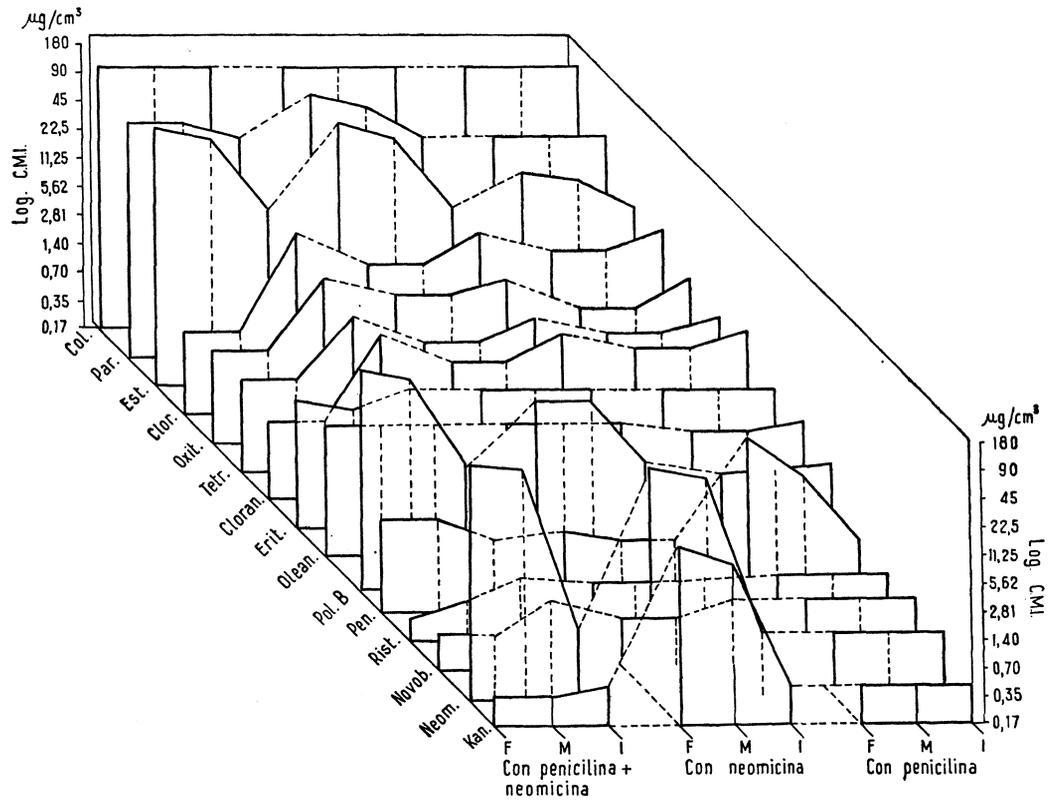


Figura 4

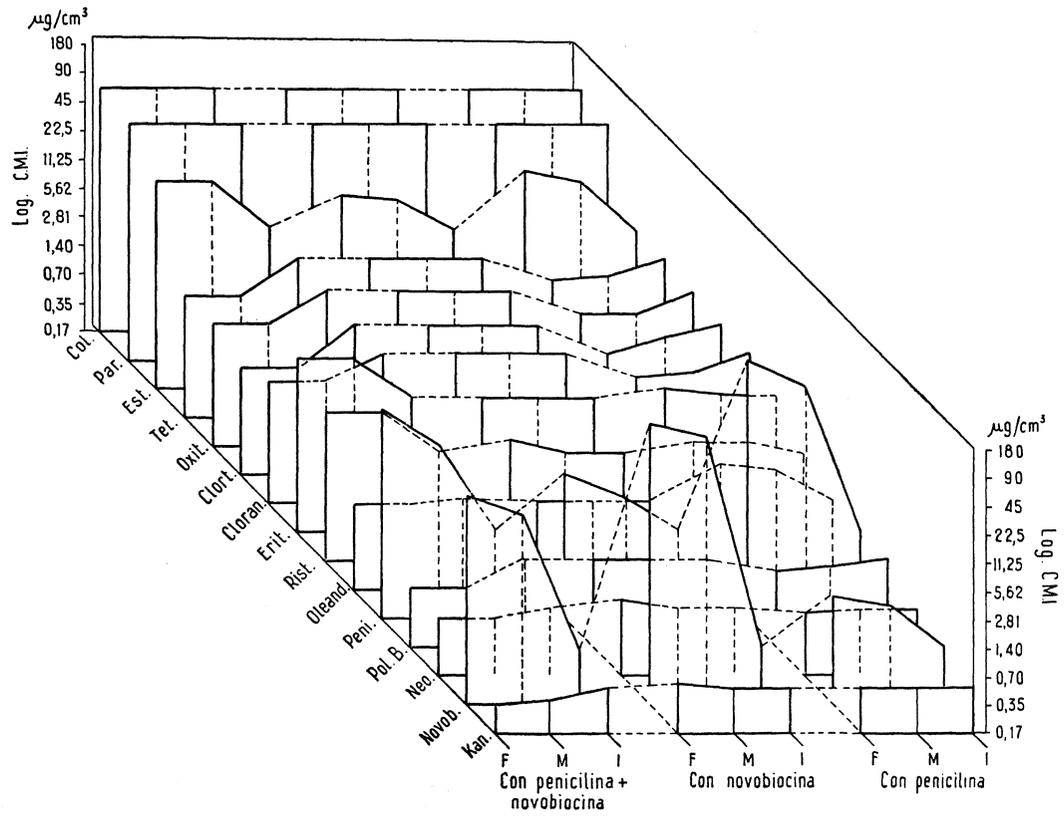


Figura 5

tibiótico del antibiograma) en los que se manifiestan las variaciones de antibióticosensibilidad en función del momento de adaptación.

### DISCUSION

En relación con la implantación de resistencia frente a los antibióticos aislados es posible observar alguna diferencia en la respuesta antibióticorresistente. Esta se alcanza bruscamente para la kanamicina, neomicina y algunos casos de novobiocina, con lo que a las pocas resiembras, las bacterias alcanzan su máximo de resistencia; sin embargo, con la penicilina sigue una progresión de pendiente menos pronunciada y con más fluctuaciones.

En las series de adaptación frente a las asociaciones antibióticas nunca aparece esta brusca implantación de resistencia y en todos los casos hay una marcada disminución del nivel de resistencia alcanzado.

Pese a que para esta publicación se han seleccionado aquellos casos en los que al hacer un examen comparativo se pudieran evitar las variables debidas a diferencias de especie bacteriana y de la interacción resultante, y a que, incluso, en todos existe un elemento común —la penicilina—, también se puede observar que la variabilidad de comportamiento de las asociaciones antibióticas observada en otras ocasiones puede llegar incluso a nivel de la cepa y para una misma asociación, según el estado de resistencia de dicha cepa, como puede verse al aplicar la técnica de <sup>1</sup>Welch al diagnóstico de la interacción a lo largo de toda una misma experiencia de adaptación. Por ejemplo, en la cepa 107 de estafilococo frente a penicilina + novobiocina, en la fase inicial no hay sinergismo, como lo prueba el hecho de que en la experiencia casi coinciden los puntos de origen y está matemáticamente demostrado, porque al aplicar la fórmula de <sup>1</sup>Welch, el índice de interacción es igual a 1,71; no obstante lo cual, dados los resultados que obtuvimos con las otras cepas, lo incluimos en el grupo de los sinergismos, y efectivamente, se pudo ver que ya en la primera resiembra, al aplicar la fórmula nuevamente, el índice varía a 0,75, y que en la última resiembra llega al orden de 0,02.

Ahora, al examinar el problema, pensando en si las asociaciones antibióticas aumentan o no la aparición de resistencias inespecíficas, vemos que cuando los estafilococos se hacen resistentes de un modo adapta-

tivo a una asociación que muestra sinergismo y entre cuyos componentes no hay resistencia cruzada, paralelo al aumento de una doble resistencia hacia sus componentes, es posible encontrar una serie de resistencias cruzadas que recuerdan las resistencias cruzadas correspondientes a las drogas que componen esta asociación.

De cualquier modo, en esta resistencia múltiple, el nivel de antibioticorresistencia a las drogas aisladas es más bajo cuando se utilizan los antibióticos asociados y siempre dependiente de las características originales de la cepa.

Asimismo, hemos encontrado incrementos de antibióticosensibilidad colateral por el empleo de asociaciones antibióticas: paralelo al aumento de una doble resistencia a penicilina y neomicina se encuentran manifiestos incrementos de sensibilidad frente a cloranfenicol y tetraciclinas y algo a ristocetina y novobiocina; lo mismo puede decirse para las asociaciones de penicilina y novobiocina o kanamicina, en las que, junto con la aparición de la doble resistencia a los componentes, se observa una mayor susceptibilidad para tetraciclinas, cloranfenicol y polimixina B. Ello hace suponer que las modificaciones producidas en el metabolismo bacteriano normal por los procesos adaptativos hipersensibilizan al microorganismo para acciones antibióticas de distinto mecanismo al que originó la resistencia.

#### RESUMEN

Se estudia la interacción de penicilina con neomicina, novobiocina y kanamicina frente a cepas de estafilococos patógenos y después de producir incrementos de doble resistencia por adaptación se valoran cuantitativamente las modificaciones producidas en sus espectros de antibióticosensibilidad.

Se ha comprobado que en las tres asociaciones hay una interacción sinérgica que produce una marcada disminución en los niveles de resistencia a los componentes y que paralelamente a estas dobles resistencias se originan incrementos de antibióticosensibilidad para drogas con distinto mecanismo de acción a los que actuaron en la adaptación.

## SUMMARY

The synergist behaviours of different associations between penicillin and neomycin, novobiocine or kanamycin on several bacteria are studied. At the same time the authors compare in these resistant strains, the levels of cross-resistance against others drugs.

## BIBLIOGRAFIA

1. BARBER, M.; CSILLAG, A., y MEDWAY, A. J. 1958. *Brit. Med. J.*, 2, 1.377.
2. DOWLING, H. F. 1957. *J. Am. Med. Assoc.*, 164, 44.
3. FUSILLO, M. H. 1956. *Antibiot. Chemotherapy*, 6, 325.
4. GALLEGO, A. 1959. *Proc. Congr. Intern. Biochem.* 4th Viena.
5. GARROD, L. P. 1953. *Brit. Med. J.*, 1, 953.
6. HSIE, J., y BRYSON, V. 1950. *Am. Rev. Tuberc.*, 62, 286.
7. JANN, G. J.; STREITFELD, M. M., y SALLE, A. J. 1952. *J. Bacteriol.*, 63, 353.
8. JAWETZ, E. 1958. *Arch. Internal Med.*, 103, 464.
9. KIMMELMAN, L. J.; ZINSSER, H. H., y KLEIN, M. 1951. *J. Urol.*, 65, 668. En SCHNITZE. *Drug-resistence*.
10. KRONIG, B., y PAUL, Th. 1897. En BROCK (ed.). 1961. *Milestones in Microbiology*. Londres.
11. LACEY, B. W. 1960. *Brit. Med. Bull.*, 16, 42.
12. MOLOMUT, N.; WARSHAW, L. J., y GROSS, E. M. 1956. *J. Am. Med. Assoc.*, 160, 967.
13. PORTOLES, A. 1959. *Asociaciones de antibióticos y resistencia bacteriana*. Fundación «Juan March». Madrid.
14. PORTOLES, A. 1961. *Microbiol. Españ.*, 14, 17.
15. PURCELL, E. M.; WRIGHT, S. S., y FINLAND, M. 1953. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 82, 124.
16. TOMPSETT, R. 1958. *Am. J. Med. Sci.*, 235, 585.
17. WELCH, H. 1956. *Antibiot. Chemotherapy*, 6, 321.
18. WRIGHT, S. S.; PURCELL, E. M.; WILCOX, C.; BRODERICK, M. K., y FINLAND, M. 1953. *J. Lab. Clin. Med.*, 42, 877.
19. WRIGHT, S. S.; PURCELL, E. M.; WILCOX, C.; BRODERICK, M. K., y FINLAND, M. 1954. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 85, 128.

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

## VALORACION DE LA ANTIBIOTICORRESISTENCIA DE BACILOS GRAM-NEGATIVOS SOMETIDOS A INTERACCIONES ANTIBACTERIANAS DE CARACTER SINERGICO

por

M.<sup>a</sup> TERESA PEREZ - UREÑA

### INTRODUCCION

Después de estudiar, en un trabajo precedente, la antibioticorresistencia de gérmenes gram-positivos que se habían tratado por asociaciones de drogas bactericidas con interacción, sinérgicas (1), hemos querido comprobar si existían variaciones en los resultados cuando estos sinergismos estaban originados por asociaciones con una o dos sustancias bacteriostáticas, o se ejercían sobre bacterias con un metabolismo diferente al de los cocos gram-positivos.

En el presente trabajo hemos hecho actuar distintas asociaciones de un bacteriostático y un bactericida, o dos bacteriostáticos frente a bacterias de extensa e inespecífica capacidad de nutrición, como son las pertenecientes a las enterobacterias y al género *Pseudomonas*.

### MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron bacterias procedentes de muestras patológicas, las cuales se sembraron varias veces en medios exentos de antibióticos. Estos gérmenes pertenecían a las especies: *Escherichia coli* (9 cepas), *Proteus vulgaris* (3 cepas) y *Pseudomonas aeruginosa* (3 cepas).

Los *antibióticos y medios de cultivo* empleados fueron los mismos del trabajo que anteriormente se cita (1), aunque para las pruebas de adaptación *in vitro* se usaron las cinco asociaciones que se indican en el apartado correspondiente a los resultados.

La *marcha de trabajo* consistió en: a) determinación de la concentración mínima inhibidora (C. M. I.) de quince antibióticos distintos frente a cada cepa bacteriana; b) estudio comparativo de la adaptación a la resistencia *in vitro*, de las cepas, frente a cada una de las cinco asociaciones y a sus componentes; c) examen de las variaciones producidas en el comportamiento de las cepas resistentes frente a los distintos antibióticos aislados; y d) control de la persistencia del estado antibióticorresistente mediante nueva determinación de la C. M. I. frente a las asociaciones y sus componentes, después de ocho resiembras semanales en agar común exento de antibióticos.

De las *técnicas* para determinar la C. M. I. sobre medio líquido con indicador de rH y para lograr la adaptación a la resistencia *in vitro*, ya se habló en el trabajo de referencia (1).

## RESULTADOS

Después de indicar las asociaciones antibióticas y las cepas bacterianas que han intervenido en los distintos ensayos (*cuadro 1*) se recogen los resultados obtenidos para las pruebas de adaptación en las sucesivas resiembras efectuadas cada cuarenta y ocho horas sobre medio líquido, con concentraciones crecientes de antibióticos (*cuadros 2-6*). En los *cuadros 7-11*, se pueden ver las variaciones que las cepas experimentan en sus antibiogramas, frente a los quince antibióticos, según van haciéndose resistentes a las distintas asociaciones o a sus componentes aislados; los valores han sido determinados al principio del tratamiento (1) a la sexta resiembra (M) y en la once (F). En el *cuadro 12* se presentan los resultados correspondientes a la duración de los distintos estados de antibióticorresistencia después de varias resiembras en medios exentos de antibióticos.

Cuadro 1

Experiencias	Asociaciones antibióticas	Bacterias	Resultados en los cuadros
I	Cloranfenicol + paromomicina	<i>Eschericia coli</i> cepas P13B, 14B y 15B	2 y 7
II	Cloranfenicol + kanamicina	<i>Proteus vulgaris</i> cepas P67, 70 y 75	3 y 8
III	Kanamicina + clorotetraciclina	<i>E. coli</i> cepas P69, 79 y 78	4 y 9
IV	Clorotetraciclina + neomicina	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> cepas P43, 45 y 47	5 y 10
V	Estreptomicina + colimicina	<i>E. coli</i> cepas P13, 14 y 15	6 y 11

*Cuadro 2. Series para adaptación a la antibiotorresistencia de cepas de colibacilos, frente a cloranfenicol, paromomicina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Número de resiembra	Cepa P13B			Cepa P14B			Cepa P15B		
	Serie clor.	Serie par.	Serie clor. + par.	Serie clor.	Serie par.	Serie clor. + par.	Serie clor.	Serie par.	Serie clor. + par.
Inic.	5,62	2,1	1,3 + 0,5	2,81	2,1	1,3 + 0,5	5,62	1,4	1,05 + 0,4
1. <sup>a</sup>	11,25	2,81	2,81 + 1,05	2,81	2,81	1,3 + 0,5	11,25	2,1	1,05 + 0,4
2. <sup>a</sup>	22,5	33,7	16,8 + 5,62	5,62	22,5	2,81 + 1,05	33,7	33,7	2,81 + 1,4
3. <sup>a</sup>	45,0	45,0	16,8 + 5,62	11,25	33,7	22,5 + 8,4	45,0	33,7	16,8 + 8,4
4. <sup>a</sup>	45,0	45,0	16,8 + 5,62	22,5	45,0	16,8 + 5,62	45,0	45,0	16,8 + 8,4
5. <sup>a</sup>	45,0	33,7	33,7 + 11,25	45,0	67,5	33,7 + 11,25	45,0	45,0	33,7 + 16,8
6. <sup>a</sup>	90,0	67,5	33,7 + 11,25	45,0	67,5	67,5 + 22,5	90,0	45,0	67,5 + 33,7
7. <sup>a</sup>	120,0	67,5	67,5 + 22,5	90,0	67,5	67,5 + 22,5	90,0	33,7	33,7 + 16,8
8. <sup>a</sup>	180,0	67,5	33,7 + 11,25	90,0	45,0	67,5 + 22,5	90,0	67,5	67,5 + 33,7
9. <sup>a</sup>	180,0	67,5	67,5 + 22,5	120,0	67,5	67,5 + 22,5	120,0	67,5	67,5 + 33,7
10. <sup>a</sup>	120,0	67,5	67,5 + 22,5	180,0	67,5	67,5 + 22,5	180,0	67,5	33,7 + 16,8
11. <sup>a</sup>	120,0	67,5	67,5 + 22,5	180,0	67,5	67,5 + 22,5	180,0	67,5	33,7 + 16,8

*Cuadro 3. Series para adaptación a la antibiotorresistencia de cepas de Proteus, frente a cloranfenicol, kanamicina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Número de resiembra	Cepa 67			Cepa 70			Cepa 75		
	Serie clor.	Serie kan.	Serie clor. + kan.	Serie clor.	Serie kan.	Serie clor. + kan.	Serie clor.	Serie kan.	Serie clor. + kan.
Inic.	11,25	37,5	1,4 + 4,68	16,8	14,06	4,2 + 3,5	67,5	14,06	18,46 + 1,75
1.ª	37,7	56,25	2,1 + 7,03	16,8	28,12	4,2 + 3,5	90,0	28,12	8,4 + 1,75
2.ª	22,5	28,12	2,1 + 7,03	22,5	18,75	4,2 + 3,5	90,0	14,06	11,25 + 2,34
3.ª	45,0	75,0	1,4 + 4,68	16,8	18,75	4,2 + 3,5	90,0	56,25	8,4 + 1,75
4.ª	45,0	75,0	2,1 + 7,03	33,7	56,25	5,62 + 4,68	135	18,75	8,4 + 1,75
5.ª	33,7	56,25	2,1 + 7,03	33,7	75,0	4,2 + 3,5	90,0	75,0	8,4 + 1,75
6.ª	67,5	112,5	2,81 + 9,37	22,5	56,25	5,62 + 4,68	135	75,0	5,62 + 1,17
7.ª	67,5	112,5	4,2 + 14,06	22,5	75,0	5,62 + 4,68	90,0	56,25	8,4 + 1,75
8.ª	45,0	75,0	2,81 + 9,37	45,0	75,0	5,62 + 4,68	90,0	75,0	11,25 + 2,34
9.ª	67,5	150	4,2 + 14,06	33,7	112,5	4,2 + 3,5	90,0	150	11,25 + 2,34
10.ª	67,5	150	2,81 + 9,37	45,0	75,0	4,2 + 3,5	135	150	11,25 + 2,34
11.ª	67,5	150	2,81 + 9,37	67,5	75,0	4,2 + 3,5	135	150	11,25 + 2,34

*Cuadro 4. Series para adaptación a la antibiotoxicidad de cepas de colibacilo, frente a kanamicina, clorotetraciclina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Número de resiembra	Cepa P69			Cepa P79			Cepa P78		
	Serie kan.	Serie clort.	Serie kan. + clort.	Serie kan.	Serie clort.	Serie kan. + clort.	Serie kan.	Serie clort.	Serie kan. + clort.
Inic.	4,68	2,8	0,28 + 0,17	1,4	0,34	0,28 + 0,17	3,5	1,4	0,28 + 0,17
1.ª	14,06	2,1	0,56 + 0,35	18,75	2,1	0,56 + 0,35	4,68	1,75	0,87 + 0,5
2.ª	18,75	11,25	3,5 + 2,5	28,12	8,4	3,5 + 2,1	14,06	2,81	3,5 + 2,1
3.ª	56,25	22,5	3,5 + 2,5	56,25	16,8	3,5 + 2,1	56,25	8,4	3,5 + 2,1
4.ª	9,37	45,0	9,37 + 5,62	56,25	33,7	3,5 + 2,1	14,06	33,7	7,03 + 4,2
5.ª	28,12	22,5	14,06 + 8,4	37,5	22,5	9,37 + 5,62	28,12	22,5	14,06 + 8,4
6.ª	28,12	45,0	14,06 + 8,4	37,5	33,7	14,06 + 8,4	28,12	33,7	28,12 + 16,8
7.ª	37,5	45,0	28,12 + 16,8	56,25	45,0	14,06 + 8,4	37,5	45,0	18,75 + 11,25
8.ª	37,5	45,0	18,75 + 11,25	37,5	45,0	9,37 + 5,62	56,25	45,0	28,12 + 16,8
9.ª	37,5	45,0	18,75 + 11,25	37,5	90,0	28,12 + 16,8	37,5	45,0	28,12 + 16,8
10.ª	75,0	90,0	28,12 + 16,8	37,5	90,0	28,12 + 16,8	37,5	90,0	28,12 + 16,8
11.ª	75,0	135	28,12 + 16,8	37,5	90,0	28,12 + 16,8	37,5	90,0	28,12 + 16,8

*Cuadro 5. Series para adaptación a la antibioticorresistencia de cepas de piocianico, frente a clorotetraciclina, neomicina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Número de resiembra	Cepa P43			Cepa P45			Cepa P47		
	Serie clort.	Serie neom.	Serie clort. + neom.	Serie clort.	Serie neom.	Serie clort. + neom.	Serie clort.	Serie neom.	Serie clort. + neom.
Inic.	5,62	22,5	0,5 + 2,1	2,1	4,2	0,25+0,5	4,2	1,4	1,05+0,35
1. <sup>a</sup>	8,4	16,8	0,5 + 2,1	1,4	5,62	1,17+2,1	5,62	4,2	1,05+0,35
2. <sup>a</sup>	5,62	33,7	0,7 + 2,81	2,81	16,8	1,17+2,1	8,4	11,25	1,4 + 0,5
3. <sup>a</sup>	11,25	33,7	1,05+ 4,2	5,68	11,25	1,75+4,2	8,4	8,4	2,1 + 0,7
4. <sup>a</sup>	33,7	67,5	1,4 + 5,62	11,25	33,7	1,75+4,2	5,62	16,8	1,4 + 0,5
5. <sup>a</sup>	33,7	67,5	2,8 +11,25	33,7	45,0	1,75+4,2	11,25	67,5	2,81+1,4
6. <sup>a</sup>	67,5	67,5	2,8 +11,25	22,5	67,5	1,75+4,2	33,7	45,0	2,81+1,4
7. <sup>a</sup>	45,0	67,5	2,8 +11,25	45,0	67,5	1,75+4,2	22,5	67,5	2,81+1,4
8. <sup>a</sup>	67,5	67,5	2,8 +11,25	67,5	67,5	1,75+4,2	45,0	67,5	2,81+1,4
9. <sup>a</sup>	90,0	67,5	2,8 +11,25	67,5	67,5	1,75+4,2	67,5	67,5	2,81+1,4
10. <sup>a</sup>	90,0	67,5	2,8 +11,25	90,0	67,5	1,75+4,2	67,5	67,5	2,81+1,4
11. <sup>a</sup>	90,0	67,5	2,8 +11,25	90,0	67,5	1,75+4,2	90,0	67,5	2,81+1,4

*Cuadro 6. Series para adaptación a la antibioticorresistencia de cepas de colibacilo, frente a estreptomycin, colimicina y sus asociaciones. Variaciones en las C. M. I., según las distintas resiembras, cada cuarenta y ocho horas*

Número de resiembra	Cepa 13			Cepa 14			Cepa 15		
	Serie est.	Serie col.	Serie est. + col.	Serie est.	Serie col.	Serie est. + col.	Serie est.	Serie col.	Serie est. + col.
Inic.	6,4	2,4	1,6+0,6	3,2	0,6	0,4+0,075	25,0	1,8	3,1+0,22
1. <sup>a</sup>	7,03	2,81	2,4+0,9	7,03	0,7	0,4+0,075	37,5	2,1	4,6+0,33
2. <sup>a</sup>	7,03	2,81	1,6+0,6	4,68	1,4	0,8+0,15	28,12	2,81	6,2+0,45
3. <sup>a</sup>	18,75	5,62	2,4+0,9	28,12	4,2	0,8+0,15	75,0	5,62	6,2+0,45
4. <sup>a</sup>	14,06	4,2	1,6+0,6	28,12	2,81	0,8+0,15	112,5	5,62	4,6+0,33
5. <sup>a</sup>	37,5	11,25	3,2+1,2	56,25	11,25	0,4+0,075	150	11,25	9,3+0,67
6. <sup>a</sup>	75,0	8,4	3,2+1,2	75,0	11,25	1,6+0,3	150	8,4	9,3+0,67
7. <sup>a</sup>	112,5	33,7	3,2+1,2	75,0	22,5	1,6+0,3	150	33,7	9,3+0,67
8. <sup>a</sup>	150	22,5	1,6+0,6	75,0	16,8	3,2+0,6	150	22,5	9,3+0,67
9. <sup>a</sup>	150	22,5	3,2+1,2	75,0	16,8	1,6+0,3	150	45,0	9,3+0,67
10. <sup>a</sup>	150	45,0	3,2+1,2	75,0	33,7	3,2+0,6	150	45,0	9,3+0,67
11. <sup>a</sup>	150	45,0	3,2+1,2	75,0	33,7	3,2+0,6	150	45,0	9,3+0,67

Cuadro 7. Variaciones en los antibiogramas de cepas colibacil

Cepas	Trata- miento	Fa- se (*)	Antibiogramas: C. M. I					
			Peni- cilina	Estrep- tomicina	Cloran- fenicol	Tetra- ciclina	Clorote- traciclina	Oxiti- traciclina
P13B	Clor.	I	120	0,56	5,62	0,34	2,80	4
		M	120	1,75	45,0	22,5	45,0	22
		F	120	7,03	120	90,0	180	180
	Par.	M	120	18,75	5,62	4,2	5,62	4
		F	120	56,25	8,4	11,25	11,25	5
	Clor. +par.	M	120	2,34	67,5	22,5	22,5	11
F	120	4,68	180	90,0	90,0	90		
P14B	Clor.	I	120	0,87	2,81	0,5	0,34	2
		M	120	1,17	45,0	33,7	33,7	33
		F	120	7,03	180	90,0	135	135
	Par.	M	120	28,12	2,81	2,81	5,62	5
		F	120	56,25	4,2	11,25	11,25	8
	Clor. +par.	M	120	1,75	45,0	33,7	33,7	33
F	120	7,03	180	90,0	90,0	90		
P15B	Clor.	I	120	0,56	4,2	0,35	1,4	2
		M	120	0,87	67,5	11,25	8,4	11
		F	120	3,5	120	90,0	90,0	90
	Par.	M	120	14,06	4,2	5,62	4,2	4
		F	120	75,0	8,4	11,25	8,4	8
	Clor. +par.	M	120	2,34	67,5	22,5	22,5	33
F	120	3,5	180	90,0	90,0	90		

(\*) Fases de adaptación que se distinguen: inicial (I), intermedia (M) y final (F).

adas con cloranfenicol, paromomicina o su asociación

biótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
itro- micina	Poli- mixina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina
33,6	0,36	1,40	120	135	150	4,68	0,34	2,10
30,0	0,36	2,81	120	135	150	2,34	0,24	5,62
30,0	0,36	4,2	120	135	150	14,06	0,24	8,4
33,6	0,36	18,7	120	135	150	22,5	0,34	33,7
35,0	0,36	56,2	120	135	150	45,0	0,34	67,5
30,0	0,21	0,7	120	135	150	1,75	0,12	5,62
30,0	0,21	2,81	120	135	150	7,03	0,12	5,62
15,0	0,7	1,4	90,0	90,0	120	1,4	1,05	2,1
30,0	0,7	2,81	90,0	90,0	120	3,5	0,7	2,81
30,0	0,7	2,81	90,0	90,0	120	18,75	0,7	4,2
15,0	0,7	28,12	90,0	90,0	120	22,5	0,5	67,5
30,0	0,7	56,25	90,0	90,0	120	45,0	0,5	67,5
30,0	0,35	0,35	90,0	90,0	120	2,34	0,35	5,62
30,0	0,35	2,81	90,0	90,0	120	7,03	0,35	5,62
33,6	0,43	1,05	112,5	120	150	3,5	0,5	1,4
45,0	0,43	2,1	112,5	120	150	2,34	0,35	5,62
30,0	0,43	4,2	112,5	120	150	4,68	0,35	8,4
33,6	0,43	11,25	112,5	120	150	33,7	0,5	45,0
45,0	0,43	45,0	112,5	120	150	67,5	0,5	67,5
90,0	0,28	0,5	112,5	120	150	2,8	0,17	4,2
90,0	0,28	2,1	112,5	120	150	8,4	0,17	5,62

Cuadro 8. Variaciones en los antibiogramas de cepas

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C. M.					
			Penicilina	Estreptomomicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitetraciclina
P67	Clor.	I	90,0	14,06	11,25	33,7	45,0	67,5
		M	90,0	14,06	67,5	45,0	45,0	90,0
		F	90,0	18,75	67,5	67,5	67,5	90,0
	Kan.	M	90,0	37,5	11,25	33,7	45,0	67,5
		F	90,0	75,0	16,8	33,7	45,0	67,5
	Clor. + kan.	M	90,0	28,12	22,5	11,25	11,25	22,5
		F	90,0	56,25	22,5	11,25	11,25	22,5
	P70	Clor.	I	90,0	9,37	16,8	45,0	33,7
M			90,0	9,37	22,5	45,0	45,0	67,5
F			90,0	9,37	67,5	90,0	90,0	112,5
Kan.		M	90,0	37,5	16,8	45,0	33,7	67,5
		F	90,0	56,25	16,8	45,0	33,7	67,5
Clor. + kan.		M	90,0	37,5	11,25	22,5	22,5	11,25
		F	90,0	37,5	11,25	22,5	22,5	22,5
P75		Clor.	I	90,0	18,75	67,5	33,7	45,0
	M		90,0	18,75	135	45,0	67,5	67,5
	F		90,0	28,12	135	45,0	90,0	90,0
	Kan.	M	90,0	56,25	67,5	33,7	45,0	67,5
		F	90,0	75,0	67,5	22,5	45,0	67,5
	Clor. + kan.	M	90,0	14,06	33,7	11,25	22,5	16,8
		F	90,0	14,06	33,7	22,5	22,5	16,8

ceus tratadas con cloranfenicol, kanamicina o su asociación

Células/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
tro- cina	Poli- mixina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina
0,0	14,06	4,2	18,75	90,0	120,0	37,5	16,8	33,7
0,0	14,06	2,81	28,12	90,0	120,0	37,5	22,25	33,7
0,0	14,06	2,81	28,12	90,0	120,0	37,5	22,5	33,7
0,0	14,06	33,7	37,5	90,0	120,0	112,5	16,8	67,5
0,0	18,75	45,0	37,5	90,0	120,0	150	16,8	90,0
0,0	7,03	22,5	37,5	90,0	120,0	56,25	16,8	45,0
0,0	9,37	22,5	37,5	90,0	120,0	56,25	16,8	45,0
0,0	9,37	2,81	18,75	90,0	120,0	14,06	22,5	45,0
0,0	9,37	2,81	18,75	90,0	120,0	14,06	33,7	45,0
0,0	9,37	2,81	18,75	90,0	120,0	14,06	33,7	45,0
0,0	9,37	33,7	28,12	90,0	120,0	56,25	22,5	90,0
0,0	14,06	67,5	28,12	90,0	120,0	75,0	22,5	120
0,0	4,68	22,5	14,06	90,0	120,0	37,5	22,5	45,0
0,0	4,68	33,7	14,06	90,0	120,0	37,5	22,5	45,0
0,0	14,06	5,62	14,06	90,0	120,0	14,06	11,25	33,7
0,0	14,06	5,62	14,06	90,0	120,0	14,06	11,25	33,7
0,0	14,06	5,62	18,75	90,0	120,0	14,06	22,5	33,7
0,0	18,75	45,0	28,12	90,0	120,0	75,0	11,25	90,0
0,0	18,75	90,0	37,5	90,0	120,0	150,0	11,25	90,0
0,0	9,37	33,7	9,37	90,0	120,0	75,0	11,25	45,0
0,0	9,37	45,0	9,37	90,0	120,0	75,0	11,25	45,0

Cuadro 9. Variaciones en los antibiogramas de cepas colibacila

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C. M. I					
			Penicilina	Estreptomomicina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxitetraciclina
P69	Kan.	I	120	0,56	5,62	0,34	2,80	4,2
		M	120	1,75	0,17	0,17	2,80	0,1
		F	120	56,25	2,81	2,81	5,62	0,1
	Clort.	M	90,0	0,56	90,0	45,0	22,5	22,5
		F	120	1,12	120	120	120	90,0
	Kan. + clort.	M	90,0	1,75	4,2	11,25	22,5	4,2
F		90,0	9,37	33,7	22,5	33,7	5,6	
P79	Kan.	I	120	0,87	2,81	0,5	0,34	2,8
		M	120	1,17	0,7	0,17	0,34	0,5
		F	120	28,12	1,4	2,81	5,62	0,5
	Clort.	M	90,0	0,87	45,0	33,7	22,5	33,7
		F	120	1,17	90,0	120	90,0	90,0
	Kan. + clort.	M	120	2,34	2,8	16,8	22,5	2,8
F		120	9,37	22,5	22,5	33,7	5,6	
P78	Kan.	I	120	0,56	4,2	0,35	1,4	2,1
		M	120	1,75	0,12	0,17	1,05	0,5
		F	120	37,5	2,1	2,1	4,2	0,5
	Clort.	M	120	0,56	90,0	67,5	28,12	33,7
		F	120	1,17	120	120	90,0	90,0
	Kan. + clort.	M	120	1,75	4,2	16,8	16,8	2,8
F		120	7,03	22,5	22,5	22,5	8,4	

adas con kanamicina, clorotetraciclina o su asociación

Antibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
Clotro- cina	Poli- mixina	Neo- micina	Novo- biocina	Oleando- micina	Risto- cetinina	Kana- micina	Coli- micina	Paromo- micina
1,6	0,36	1,4	120	135	150	4,68	0,34	2,10
1,4	0,28	8,4	120	135	150	28,12	0,17	45,0
1,0	0,28	33,7	120	135	150	75,0	0,17	90,0
1,0	0,28	0,17	120	135	150	4,68	0,17	2,1
1,0	0,28	0,17	120	135	150	4,68	0,17	2,1
1,0	0,28	9,37	120	135	150	14,06	0,17	22,5
1,0	0,28	18,75	120	135	150	37,5	0,17	45,0
5,0	0,7	1,4	90,0	90,0	120	1,4	1,05	2,1
1,25	0,35	11,25	90,0	90,0	120	37,5	0,5	67,5
3,7	0,35	45,0	90,0	90,0	120	37,5	0,5	90,0
1,0	0,35	0,35	90,0	90,0	120	1,4	0,5	2,1
1,0	0,35	0,35	90,0	90,0	120	2,8	0,5	2,1
1,0	0,35	9,37	90,0	90,0	120	18,75	0,5	22,5
1,0	0,35	18,75	90,0	90,0	120	28,12	0,5	45,0
3,6	0,43	1,05	112,5	120	150	3,5	0,5	1,4
5,62	0,28	5,62	112,5	120	150	28,12	0,25	45,0
2,5	0,28	22,5	112,5	120	150	37,5	0,25	90,0
0,0	0,28	0,25	112,5	120	150	3,5	0,25	1,4
0,0	0,28	0,25	112,5	120	150	3,5	0,25	1,4
0,0	0,28	7,03	112,5	120	150	18,75	0,25	16,8
0,0	0,28	14,06	112,5	120	150	37,5	0,25	67,5

Cuadro 10. Variaciones en los antibiogramas de cepas

Cepas	Tratamiento	Fase	Antibiogramas: C. M. I.					
			Penicilina	Estreptomina	Cloranfenicol	Tetraciclina	Clorotetraciclina	Oxite-tracicl
P43	Clort.	I	90,0	28,12	11,25	2,81	5,62	11,2
		M	90,0	75,0	90,0	33,7	67,5	16,8
	Neom.	F	90,0	112,5	180,0	45,0	90,0	22,5
		M	3,75	112,5	4,2	1,4	0,25	16,8
	Clort. + neom.	F	3,75	150	4,2	1,4	0,25	33,7
		M	3,75	28,12	8,4	1,4	67,5	22,5
P45	Clort.	F	3,75	28,12	8,4	1,4	67,5	33,7
		I	90,0	18,75	8,4	2,1	2,1	8,4
	Neom.	M	90,0	56,25	67,5	22,5	22,5	16,8
		F	90,0	75,0	90,0	67,5	90,0	33,7
	Clort. + neom.	M	5,62	75,0	2,81	1,4	1,05	2,1
		F	5,62	150	2,81	1,4	1,05	2,1
P47	Clort.	M	5,62	18,75	5,62	2,1	45,0	11,2
		F	3,75	18,75	5,62	2,1	67,5	22,5
	Neom.	I	90,0	37,5	16,8	4,2	4,2	8,4
		M	90,0	75,0	120	45,0	33,7	22,5
	Clort. + neom.	F	120	150	180	90,0	90,0	67,5
		M	5,62	112,5	5,62	2,1	1,4	11,2
Clort. + neom.	F	8,4	150	5,62	2,1	1,4	8,4	
	M	4,2	37,5	8,4	2,1	33,7	11,2	
Clort. + neom.	F	4,2	37,5	8,4	2,1	67,5	22,5	
	F	4,2	37,5	8,4	2,1	67,5	22,5	

## Bacteriocinogénicas tratadas con clorotetraciclina, neomicina o su asociación

Antibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
Eritromicina	Policimicina	Neomicina	Novobiocina	Oleandomicina	Ristocetina	Kanamicina	Colimicina	Paromomicina
90,0	1,4	22,5	90,0	90,0	90,0	9,37	120	67,5
90,0	0,28	1,4	90,0	90,0	90,0	4,2	1,4	2,81
90,0	0,28	1,4	90,0	90,0	90,0	4,2	1,4	2,81
1,4	90,0	67,5	22,5	90,0	2,81	67,5	120	120
1,4	90,0	67,5	22,5	90,0	2,81	90,0	120	120
1,05	90,0	2,1	22,5	90,0	0,5	2,34	120	8,4
1,05	90,0	2,1	33,7	90,0	0,5	2,34	120	11,25
67,5	1,17	4,2	67,5	90,0	90,0	7,03	90,0	45,0
67,5	0,87	2,81	67,5	90,0	90,0	4,68	22,5	4,2
67,5	0,87	2,81	90,0	90,0	90,0	4,68	22,5	4,2
8,4	67,5	67,5	33,7	90,0	3,5	90,0	90,0	90,0
8,4	90,0	67,5	45,0	90,0	3,5	90,0	120	120
2,81	67,5	2,81	33,7	90,0	1,75	7,03	120	8,4
2,81	67,5	2,81	33,7	90,0	3,5	7,03	120	8,4
90,0	1,75	1,4	90,0	90,0	90,0	4,68	90,0	33,7
90,0	0,56	1,4	90,0	90,0	90,0	3,5	11,25	4,2
90,0	0,56	1,4	90,0	90,0	90,0	3,5	22,5	4,2
9,37	56,25	45,0	22,5	90,0	7,03	37,5	90,0	90,0
9,37	90,0	67,5	33,7	90,0	7,03	75,0	90,0	120
2,34	90,0	0,7	33,7	90,0	4,68	2,34	90,0	8,4
2,34	90,0	0,7	33,7	90,0	4,68	2,34	90,0	11,25

Cuadro II. Variaciones en los antibiogramas de cep

Cepas	Trata- miento	Fase	Antibiogramas: C. M. I. C.					
			Peni- cilina	Strept- tonicina	Cloran- fenicol	Tetra- ciclina	Cloro- traciclina	Oxite- tracili
P13	Est.	I	120	6,4	5,62	2,81	2,81	4,2
		M	120	75,0	5,62	2,81	2,81	4,2
	Col.	M	120	150	5,62	2,81	2,81	4,2
		F	120	6,4	8,4	4,2	5,62	5,62
	Est. + col.	M	120	12,8	8,4	4,2	5,62	5,62
		F	120	4,68	5,62	2,81	2,81	4,2
P14	Est.	I	90,0	3,2	2,81	5,62	4,2	2,81
		M	90,0	75,0	2,81	5,62	4,2	2,81
	Col.	M	90,0	75,0	2,81	5,62	4,2	2,81
		F	90,0	3,2	4,2	5,62	5,62	4,2
	Est. + col.	M	90,0	3,2	4,2	8,4	5,62	4,2
		F	90,0	2,34	2,81	5,62	4,2	2,81
P15	Est.	I	120	2,5	4,2	5,62	4,2	4,2
		M	120	150	4,2	5,62	4,2	4,2
	Col.	M	120	150	4,2	5,62	4,2	4,2
		F	120	2,5	5,62	8,4	4,2	5,62
	Est. + col.	M	120	2,5	5,62	8,4	4,2	5,62
		F	120	2,5	5,62	5,62	4,2	4,2

*olibacilares tratadas con estreptomycin, colimicina o su asociación*

Antibiótico/cm <sup>3</sup> de medio líquido								
Eritromicina	Policimicina	Neomicina	Novobiocina	Oleandomicina	Ristocetina	Kanamicina	Colimicina	Paromomicina
33,6	0,36	1,40	90,0	120	150	4,68	2,4	2,1
33,6	0,36	8,4	90,0	120	150	18,75	2,4	16,8
33,6	0,36	45,0	90,0	120	150	56,25	2,4	67,5
33,6	0,43	2,8	90,0	120	150	7,03	8,4	4,2
33,6	0,43	2,8	90,0	120	150	7,03	45,0	4,2
33,6	0,28	33,7	90,0	90,0	112,5	28,12	2,4	11,25
45,0	0,28	33,7	90,0	90,0	112,5	37,5	2,4	11,25
45,0	0,70	1,05	90,0	90,0	120	1,40	0,60	2,81
45,0	0,70	11,25	90,0	90,0	120	14,06	0,60	22,5
45,0	0,70	45,0	90,0	90,0	120	45,0	0,60	67,5
45,0	0,70	1,05	90,0	90,0	120	1,40	11,25	2,81
45,0	0,70	1,05	90,0	90,0	120	1,40	33,7	2,81
45,0	0,28	22,5	90,0	90,0	120	3,5	0,60	5,62
45,0	0,28	22,5	90,0	45,0	112,5	3,5	0,60	5,62
33,6	0,43	1,05	90,0	120	120	3,5	1,8	1,4
33,6	0,43	11,25	90,0	120	120	22,5	1,8	16,8
33,6	0,43	67,5	90,0	120	120	45,0	1,8	67,5
33,6	0,43	1,05	90,0	120	120	3,5	8,4	1,4
33,6	0,43	1,05	90,0	120	120	3,5	45,0	2,1
33,6	0,28	4,2	90,0	120	120	9,37	1,05	2,8
33,6	0,28	4,2	90,0	120	120	9,37	1,05	2,8

Cuadro 12. Persistencia del estado antibióticorresistente de algunas cepas bacterianas

Experiencias	Cepas	C. M. I. después de la adaptación a la resistencia a los antibióticos aislados y sus asociaciones			C. M. I. después de ocho resiembras en medios exentos de antibióticos $\mu\text{g}/\text{cm}^3$		
		A	B	A + B	A	B	A + B
Cloranfenicol (A)	P13B	120	67,5	67,5 + 22,5	7,81	5,85	2,92 + 0,97
+ paromomicina (B)	P14B	180	67,5	67,5 + 22,5	23,43	7,81	5,85 + 1,95
Cloranfenicol (A)	P67	67,5	150	2,81 + 9,37	11,71	56,25	1,95 + 5,85
+ kanamicina (B)	P75	135	150	11,25 + 2,34	31,25	23,43	3,90 + 2,92
Kanamicina (A)	P79	37,5	90,0	28,12 + 16,8	15,62	3,90	2,92 + 0,52
+ clorotetraciclina (B)	P78	37,5	90,0	28,12 + 16,8	7,81	2,92	0,97 + 0,48
Clorotetraciclina (A)	P43	90,0	67,5	2,8 + 11,25	7,81	31,25	1,95 + 7,81
+ neomicina (B)	P45	90,0	67,5	1,75 + 4,2	5,85	15,62	1,46 + 3,90
Estreptomomicina (A)	P14	75,0	33,7	3,2 + 0,6	23,43	11,71	2,92 + 0,46
+ colimicina (B)	P15	150	45,0	9,3 + 0,67	31,25	15,62	7,81 + 3,90

## DISCUSION

Por los resultados obtenidos, es posible comprobar una vez más que, pese a la pluralidad de drogas y de cepas bacterianas empleadas, en todos los casos hubo escasa elevación de los niveles de resistencia cuando se asociaron dos sustancias de interacción sinérgica.

En los ensayos de adaptación frente a las drogas aisladas, pudo apreciarse una más rápida elevación de la resistencia en las bacterias tratadas con estreptomycin, neomicina o paromomicina.

Por otra parte, cuando una bacteria se adapta *in vitro* frente a una asociación antibiótica de tipo sinérgico, también es posible comprobar que la antibioticorresistencia producida es *más débil* que cuando intervienen las drogas aisladas; es *múltiple*, porque aparecen débiles resistencias cruzadas frente a antibióticos químicamente relacionados con los componentes de la asociación y *variada*, porque también aparecen incrementos de antibiótico-sensibilidad colateral frente a otras drogas con diferentes mecanismos de acción.

## RESUMEN

Después de obtener bacterias resistentes por adaptación *in vitro* frente a cinco asociaciones sinérgicas de antibióticos, se realiza un examen comparativo del nivel de resistencia alcanzado, según que las drogas estén o no asociadas; por otra parte, también se han estudiado las variaciones producidas en los antibiogramas de estas cepas resistentes para quince antibióticos distintos.

## SUMMARY

After obtainig resistant bacterial strains against five antibiotal sinergist associations *in vitro* a comparative study of the resistance levels was carry out, either by using isolated or associated drugs. On the other hand the authors studied «cross-resistance» against fifteen different antibiotics in these strains.

## BIBLIOGRAFIA

PÉREZ-UREÑA, M. T. 1966. Microbiol. Españ., 19, 287.

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

## SUPERVIVENCIA E INFECTIVIDAD DE DISTINTAS ESTIRPES DE *RHIZOBIUM* EN DISTINTOS TIPOS DE SUELO

por

EULALIA CABEZAS DE HERRERA

### INTRODUCCION

Uno de los problemas que con más interés estudiamos en nuestro laboratorio en relación con la fijación simbiótica del nitrógeno por las leguminosas, es la selección de estirpes efectivas y obtención de mutantes resistentes a pH bajos, para adaptar el cultivo de leguminosas a los suelos del NO. de España muy apropiados para pastos por su clima, pero donde estas plantas se desarrollan muy pobremente por la excesiva acidez del suelo.

Derivado de estas experiencias, se nos planteó el problema de la supervivencia del *Rhizobium* en el suelo, de unas cosechas para otras, como medio de enriquecimiento de las tierras de labor.

Por todo ello y para el conocimiento de esta parte del problema, abordamos el estudio de la supervivencia e infectividad de distintas estirpes de *Rhizobium* en distintos tipos de suelo.

### PARTE EXPERIMENTAL

A) Tomamos una serie de muestras de tierras de distintos puntos de España, de características diferentes (*cuadro 1*).

Cuadro 1

Muestra	Procedencia	Análisis mecánico	Análisis químico Porcentaje							Pérdida por calcinación	pH
			N <sub>2</sub>	Si <sub>2</sub>	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	TiO <sub>2</sub>	CaO	MgO		
1	Almendralejo	Limo-arena fina	0,099	76,65	8,25	6,45	1,00	1,61	1,30	5,41	7,55
2	Medina del Campo	Arena con un poco de limo	0,066	77,01	10,36	2,15	0,64	0,70	0,47	2,94	7,75
3	Toledo	Arena limosa	0,133	74,96	10,95	7,52	0,40	0,85	0,55	2,35	6,70
4	Peñaranda de Bracamonte	Arena	0,083	79,36	10,55	1,36	Indicios	0,52	Indicios	1,62	7,45
5	Ecija	Limo ligeramen- te arcilloso	0,116	52,20	14,90	1,89	0,94	8,47	5,34	12,42	7,40
6	Badajoz	Arena muy fina, limosa	0,183	73,67	8,99	4,08	1,98	0,96	Indicios	5,04	6,60
7	Galicia	Limo-arcilla	0,190	75,64	9,88	5,04	1,28	0,90	Indicios	5,41	5,20

B) Seleccionamos las siguientes estirpes de *Rhizobium* procedentes de distintas leguminosas:

Estirpe núm. 1. Aislada de nódulos de *Trifolium incarnatum*, procedente de Tapias de Casariego (Asturias).

Estirpe núm. 2. Aislada de nódulos de *Phaseolus vulgaris*, procedente de Avila.

Estirpe núm. 3. Aislada de nódulos de *Vicia sativa*, procedente de Archidona (Málaga).

Estirpe núm. 4. Aislada de nódulos de *Medicago sativa*, procedente de Talavera de la Reina (Toledo).

Estirpe núm. 5. Aislada de nódulos de *Lupinus angustifolius*, procedente de Felanix (Mallorca).

Las características fisiológicas y morfológicas de estas estirpes las fijamos en un trabajo anterior (2).

Estirpe G. Aislada de nódulos de *Medicago sativa*, procedente de Talavera de la Reina (Toledo). Sus características fisiológicas y morfológicas fueron fijadas por Rubio y Tejerina (5).

C) En placa de Petri pesamos 25 g de tierra y la esterilizamos tres días consecutivos, a 180 °C, en horno de Pasteur.

D) Inoculamos los distintos tipos de tierra con cada una de las estirpes de *Rhizobium* seleccionadas y hacemos dos lotes: uno lo conservamos en sequedad y al otro le añadimos periódicamente agua destilada estéril para conservarle húmedo. Ambos les dejamos a temperatura ambiente.

Por el método de recuento en placa determinamos el número de bacterias vivas por gramo de tierra seca, inmediatamente después de efectuada la inoculación y después de determinados períodos de tiempo; al principio, cada mes, después, cada seis meses, y después, cada año.

## RESULTADOS

Las muestras que conservamos en humedad, se contaminaron al año de experiencia. Durante este período de tiempo no hubo disminución apreciable del número de células vivas, al contrario, durante los primeros meses se apreció un pequeño aumento.

En las muestras conservadas en sequedad, la estirpe G sobrevive en más de un 50 por ciento después de diez años de permanencia en los distintos tipos de suelo. Las estirpes 1-5 fueron disminuyendo en los sucesivos recuentos hasta desaparecer a los dos años de permanencia en el suelo.

Después de cada recuento, aislamos las estirpes correspondientes y con ellas inoculamos los distintos tipos de leguminosas de donde proceden y las cultivamos en agar-crone exento de nitrógeno, en tubos especiales para este fin. Todas las estirpes que sobreviven conservan su capacidad de nodulación.

## DISCUSION

Bisset (1) considera lo que nosotros llamamos forma G, como parte del ciclo evolutivo general del *Rhizobium*. Heumann (4), las describe como parte de un ciclo sexual en forma de estrella. Rubio y Tejerina (5), consideran que no forman parte del ciclo común con la forma normal del *Rhizobium*, aunque se encuentren asociadas con cierta frecuencia infectando las mismas plantas. Las describen como bacterias gram-positivas esporuladas. Sin embargo, Graham y colaboradores (3) aseguran que estas formas ni son resistentes al calor, ni forman esporas.

Nosotros hemos podido comprobar que forman endosporas y son muy resistentes, tanto al calor como al calor húmedo, a lo cual atribuimos su gran supervivencia en el suelo.

## RESUMEN

En el presente trabajo estudiamos la supervivencia e infectividad de distintas estirpes de *Rhizobium* en distintos tipos de suelos.

Las estirpes de *Rhizobium* normales, N, desaparecen a los dos años

de permanencia en el suelo. Sin embargo, la estirpe G sigue sobreviviendo en los distintos tipos de suelo en más de un 50 por ciento después de diez años de permanencia en los mismos y conservan su capacidad infectiva, es decir, de nodulación.

#### SUMMARY

Survival and infectivity of different strains of *Rhizobium* in different types of soil are studied.

The normal strains of *Rhizobium* are non viable after two years in the soils. On the contrary more than 50 per cent of cells of strain G survive in the same soils after ten years and are infective.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BISSET, K. A. 1952. Complet and reduced life cycles in *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol., 7, 233-42.
2. CABEZAS DE HERRERA, E. 1956. Infección de la alfalfa con distintas estirpes de *Rhizobium*. Anales Edafol. Fisiol. Vegetal, 15, 85-110.
3. GRAHAM, P. H.; PARKER, C. A.; DAKLEY, A. E.; LANGE, R. T., y SANDERSON, I. J. V. 1963. Spore formation and heat resistance in *Rhizobium*. J. Bacteriol., 86, 1.353.
4. HEUMAN, W. 1956. Der sexualcyclus sternbildender Bakterien. Arch. Mikrobiol., 24, 262-395.
5. RUBIO-HUERTOS, M., y TEJERINA, G. 1957. Citología y ciclos vitales del género *Rhizobium* Frank. Microbiol. Españ., 10, 305-24.

UNIVERSIDAD DE BARCELONA  
FACULTAD DE MEDICINA  
II CATEDRA DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA, HIGIENE Y SANIDAD

INVESTIGACION SOBRE LA FRECUENCIA  
DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES FRENTE  
A POLIOVIRUS (BARCELONA, 1965) (\*)

por

A. PUMAROLA y A. RODRIGUEZ-TORRES

INTRODUCCION

Al objeto de obtener una información lo más completa posible sobre la situación epidemiológica de la poliomielitis en Barcelona y sobre el grado de inmunización de la población frente a poliovirus, hemos efectuado una investigación sobre la presencia de anticuerpos frente a los tres tipos de virus poliomielíticos (reacción de seroneutralización), en un grupo de sueros, correspondientes a personas de diferentes edades, obtenidos durante el año 1965.

En el momento actual, el conocimiento del grado de inmunización de un grupo representativo de la población de Barcelona presenta el interés de que no sólo refleja los procesos de inmunización espontánea por poliovirus naturales, sino también los de inmunización inducida por vacunación, tanto por vacuna con virus inactivado, como con virus atenuado, y tanto las vacunaciones de tipo individual, como las practicadas en el curso de las campañas de vacunación en masa realizadas en estos últimos años.

---

(\*) Este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda a la Investigación por el Ministerio de Educación Nacional (Ley 50, 1963).

## MATERIAL CLINICO

Estudiamos un grupo de 270 personas cuya distribución por edades es la siguiente: 24, de 4 a 12 meses de edad; 96, de 1 a 5 años; 11, de 6 a 10; 30, de 11 a 20; 25, de 21 a 30; 22, de 31 a 40; 20, de 41 a 50; 20, de 51 a 60, y 22, de más de 60 años.

Las muestras de sangre fueron obtenidas en 1965 entre niños y adultos atendidos en diferentes centros de Barcelona con ocasión de variados reconocimientos. Los sueros, sin la adición de antisépticos, fueron conservados congelados a 25 °C hasta el momento de la prueba.

## METODO

### *Reacciones de seroneutralización*

#### 1) *Reacciones serológicas en los poliovirus*

Aunque nuestros conocimientos sobre los antígenos de los virus son rudimentarios, se puede afirmar que la estructura antigénica está en relación con la morfología, y que se presentan dos tipos generales de antígenos, que pueden ser únicos o múltiples: el *antígeno vírico*, tipo-específico, ligado a la propia partícula del virus y de naturaleza proteica; y el *antígeno soluble*, grupoespecífico, ligado a una partícula de menor tamaño, de naturaleza nucleoproteica.

En los poliovirus podemos también distinguir un antígeno vírico termolabil, asociado a la partícula activa del virus, denominado *antígeno N* o nativo, y un antígeno soluble, asociado a una partícula de 10-12 m $\mu$ , que se obtiene por inactivación de las suspensiones del virus por el calor, formol o rayos ultravioletas, denominado *antígeno D* o derivado. Mientras el antígeno N es tipoespecífico y reacciona sólo con anticuerpos del mismo tipo, generalmente en reacciones de seroneutralización, el antígeno D es grupoespecífico y fija el complemento en presencia de anticuerpos de cualquier tipo (heterotípicos).

Los anticuerpos fijadores del complemento han tenido en el estudio de la poliomiélitis una aplicación restringida, en tanto no ha sido posible la preparación de antígenos adecuados, y aún hoy día, sigue siendo éste el problema básico, como ocurre en otros procesos por virus. Por

otra parte, los anticuerpos fijadores del complemento, que tienen en la poliomiелitis un relativo valor en el diagnóstico por su precocidad de aparición, desaparecen rápidamente y se muestran inferiores a los anticuerpos neutralizantes en la apreciación del grado de inmunidad.

En el presente trabajo, nos circunscribimos al estudio de los anticuerpos responsables del efecto protector que poseen los sueros inmunes sobre las acciones patógenas del virus en un sistema huésped. Se detectan por inoculación de una mezcla suero + virus, y el sistema huésped sirve como indicador de la presencia o ausencia de virus activo en la mezcla, lo cual, inversamente, nos demostrará la ausencia o existencia de estos anticuerpos.

Las reacciones de seroneutralización utilizan como indicador de la experiencia el animal de experimentación o los cultivos celulares. En el primer caso, los anticuerpos neutralizantes pueden teóricamente determinarse siguiendo varios criterios, puesto que el poder patógeno de los virus tiene múltiples manifestaciones, y así puede determinarse la muerte de los animales o considerarse la presentación de parálisis u otras alteraciones. Al utilizar los cultivos celulares como indicador de la reacción, el efecto observable es la acción citopática o signos indirectos de su presencia, como la modificación del pH del medio.

Tanto en el animal de experimentación (4) como en los cultivos celulares (6), existe una relación lineal logarítmica entre la cantidad de virus utilizado en la prueba y la cantidad de suero requerido para neutralizar su acción. Por ello se comprende que los anticuerpos neutralizantes pueden ser determinados no sólo cualitativamente, sino también cuantitativamente. El procedimiento habitual para la obtención de estos títulos es el ensayo de diluciones progresivas del suero frente a cantidades fijas de virus previamente valorado.

## 2) *Técnicas de seroneutralización en la poliomiелitis*

Hasta 1940 el único procedimiento para determinar los anticuerpos neutralizantes era la inoculación al mono de la mezcla suero + virus. El proceso resultaba, evidentemente, prohibitivo por la gran cantidad de simios que requerían estos trabajos.

La adaptación por Armstrong de la cepa Lansing a la rata algodonera (1) y al ratón blanco (2), solucionó, hasta cierto punto, la realización de estudios epidemiológicos con respecto al tipo 2 de poliovirus,

estudiándose extensamente los anticuerpos neutralizantes del mismo, utilizando como sistema detector la inoculación intracerebral al ratón.

Los cultivos de tejidos y el desarrollo de los poliovirus en ellos han resuelto definitivamente el problema, permitiendo la investigación de los anticuerpos neutralizantes frente a los mismos. Sobre los cultivos celulares pueden realizarse dos tipos de reacciones de seroneutralización:

*a) Reacción en un sistema estático.* Es el método clásico. Se realiza en dos tiempos, uno para la obtención de un cultivo celular en tubos y otro para poner en contacto el virus con el suero e inocular la mezcla a las células. Por esta técnica se inoculan habitualmente de 100 a 300 DITC 50% de virus por tubo.

La presencia de anticuerpos se pone de manifiesto por la observación directa de la protección del efecto citopático o por un método indirecto. Cuando el medio de cultivo lleva rojo de fenol como indicador, éste se mantiene rojo, mientras el pH se encuentra entre 7,4 y 7,8, en tanto que vira a salmón o amarillo cuando el pH baja de 7. La modificación de Salk y colaboradores (17) a la técnica de seroneutralización se sirve de este efecto, teniendo en cuenta que mientras el crecimiento celular libera metabolitos ácidos, la necrosis celular no los libera, con lo cual el viraje del indicador es un signo indirecto de la neutralización del virus (10 y 15).

*b) Reacción en un sistema cinético.* Barski y Lepine (3 y 7) describieron en 1954 un micrométodo empleando los alveolos de una materia transparente en lugar de los tubos clásicos. Melnick y Opton (11) utilizan también este procedimiento, tomando como índice de destrucción celular la no modificación del pH.

Lo más interesante del micrométodo de Barski es que en él se deposita el virus, el suero y las células en una sola operación y constituye, por lo tanto, el antecedente directo de la reacción cinética en un solo tiempo. Esta reacción, descrita en 1959 por Lepine y colaboradores (8), consiste en añadir las células KB a la mezcla suero problema + virus. Es preciso, pues, que las células se reproduzcan activamente formando una capa en el fondo de finos tubos de Kahn, lo cual se consigue utilizando, no un medio de supervivencia, sino un medio de crecimiento, y de ahí el nombre de técnica cinética. Como, por otro lado, una gran dosis de virus impediría el desarrollo celular, se añade una cantidad

mínima de virus, con lo que se da tiempo a que se forme la capa celular antes de que se manifiesten las lesiones citopáticas.

Entre nosotros, la técnica cinética fue introducida por Pumarola y González-Fusté (13) y ha sido ampliamente utilizada (14 y 16).

Antes de concluir esta exposición sobre las diferentes técnicas de seroneutralización, debemos hacer constar que los títulos obtenidos con distintos métodos no son superponibles. La técnica cinética ofrece títulos más elevados que las estáticas.

### 3) Técnica utilizada

*Cultivo celular.* En nuestras experiencias utilizamos las células KB (5) procedentes de un carcinoma epidermoide del suelo de la boca, que presentan una gran sensibilidad a los poliovirus. Como medio de cultivo empleamos el descrito por Lepine y colaboradores (9).

*Reacción.* La técnica seguida en el presente trabajo es la cinética de Lepine y colaboradores (8), ampliamente descrita en el trabajo anterior de uno de nosotros (16). Los virus empleados fueron las cepas Mahoney, MEF 1 y Saukett, de los tipos 1, 2 y 3 respectivamente, con una DITC 100% al tercer día superior a  $10^{-6}$ .

Para la demostración de la presencia de anticuerpos se ha ensayado la dilución 1/10 del suero, que experimentalmente protege al mono contra la inoculación de los virus poliomiélicos.

En la reacción se incluyen un suero positivo y un suero negativo conocidos.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados se pueden dividir en dos apartados: en el primero estudiaremos la inmunización global de la población y en el segundo el grado de inmunización según los distintos grupos de edades. Por último, compararemos estos datos con los obtenidos en la encuesta practicada en 1960 (13), lo que nos permitirá conocer la evolución de la inmunización en Barcelona, en este último quinquenio.

### *Inmunización global*

Para estimar la inmunización global de la población, podemos proceder de dos maneras: 1) estudiando el grado de inmunización frente a cada tipo de poliovirus por separado, y 2) frente a todos los poliovirus conjuntamente en cada suero.

1) Efectuando la reacción de seroneutralización cualitativa en los 270 sueros, se observa que al considerar cada anticuerpo por separado (*cuadro 1*), el 85,1 % (230) presentan anticuerpos frente al tipo 1, el 83,7 % (226) frente al tipo 2, y el 86,6 % (234) frente al tipo 3. Por orden de frecuencia, el más frecuente es, pues, el tipo 3, seguido por el 1 y el 2, con diferencias poco acusadas.

2) Al considerar los tres anticuerpos en conjunto (*cuadro 1*), destaca que sólo el 1,8 % (5 casos) de los sueros investigados carecen por completo de anticuerpos; el 10 % (27) presentan un solo anticuerpo; el 17,4 % (47) poseen dos, y en el 70,7 % (191) están presentes los tres anticuerpos antipoliomielíticos. Es decir que el 88,1 % de las personas estudiadas tienen anticuerpos, por lo menos, frente a dos tipos de poliovirus, y el 98,1 %, por lo menos, frente a un tipo.

Considerando los sueros con 0 ó 1 anticuerpos como representantes de la población más receptiva, los resultados demuestran que estos sueros alcanzan al 11,8 %, mientras que la población más protegida (2 ó 3 anticuerpos) representa el 88,1 %. Examinado el porcentaje de sueros que carecen de algún anticuerpo se observa que esta circunstancia se da en el 29,2 %. Los sueros que presentan algún anticuerpo representan el 98,1 %.

3) Resulta interesante efectuar la comparación entre estos datos y los obtenidos en 1960 por Pumarola y González-Fusté, también en Barcelona, lo que nos dará una idea de la evolución de la inmunización. Teniendo en cuenta la distribución desigual de los grupos de edades, comparamos los datos globales entre 4 meses y 40 años, en ambos estudios.

De la consideración del *cuadro 2* se desprende que el grado de inmunización en Barcelona ha sufrido un notable incremento en nuestro estudio en relación con el verificado en 1960.

Cuadro 1. Inmunización global frente a poliovirus. Barcelona, 1965

Porcentaje de sueros con			
Anticuerpos del tipo 1	Anticuerpos del tipo 2		Anticuerpos del tipo 3
85,1	83,7		86,6
0 anticuerpos	1 anticuerpo	2 anticuerpos	3 anticuerpos
1,8	10,0	17,4	70,7
0 ó 1 anticuerpo		2 ó 3 anticuerpos	
11,8		88,1	

Cuadro 2. Evolución de la inmunización global frente a poliovirus. Barcelona, 1960-1965 (4 meses a 40 años)

Año	Porcentaje de sueros con			
	Anticuerpos del tipo 1	Anticuerpos del tipo 2	Anticuerpos del tipo 3	
1960	78,5	77,3	83,3	
1965	82,6	83,6	85,0	
	0 anticuerpos	1 anticuerpo	2 anticuerpos	3 anticuerpos
1960	7,1	11,9	16,7	64,2
1965	2,7	12,0	15,3	70,1
	0 ó 1 anticuerpos		2 ó 3 anticuerpos	
1960	19,0		80,9	
1965	14,7		85,4	

a) En efecto, cada uno de los tres anticuerpos antipoliomielíticos se encuentra actualmente con mayor frecuencia: 6,3 %, más frecuente el tipo 2; 4,1 %, más frecuente, el tipo 1; y 1,7 %, el tipo 3.

b) Por otra parte, los sueros carentes de anticuerpos se reducen del 7,1 % al 2,7 %, en tanto que los que poseen los tres anticuerpos se elevan del 64,2 % al 70,1 %.

c) Considerando los sueros con 0 ó 1 anticuerpos como representantes de la población más receptiva, ésta desciende del 19 % al 14,7 %, mientras que la población más protegida (2 ó 3 anticuerpos) se eleva del 80,9 % al 85,4 %.

d) Al examinar el porcentaje de sueros que carecen de algún anticuerpo (*cuadro 3*), se observa similar evolución con un descenso del 35,8 % al 29 %. Los sueros que poseen algún anticuerpo pasan del 92,9 % al 97,5 %.

*Cuadro 3. Evolución de la inmunización global frente a poliovirus. Barcelona, 1960-1965 (4 meses a 40 años)*

Año	Porcentaje de sueros que			
	No tienen anticuerpos	Carecen de algún anticuerpo	Poseen algún anticuerpo	Poseen tres anticuerpos
1960	7,1	35,8	92,9	64,2
1965	2,7	29,0	97,5	70,1

#### *Inmunización según la edad*

Distribuyendo los sueros estudiados en grupos de edades podemos realizar el estudio de la inmunización según la edad. Dado que en el estudio efectuado en 1960 se comprobó que por debajo de los 4 meses la inmunización observada es la pasiva, el grupo de menos de un año comprende los sueros de niños de 4-12 meses de edad.

1) Considerando cada anticuerpo por separado (*cuadro 4*) se comprueba que el grado de inmunización de la población es ya bastante elevado en la población de menos de 1 año, siendo de 41,6 % para el tipo 1, 70,8 % para el 2 y 50 % para el 3, pero la inmunización aumen-

Cuadro 4. Inmunización según la edad. Barcelona, 1965

Grupos de edad	Número	Tipo 1		Tipo 2		Tipo 3	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
4-12 meses	24	12	41,6	17	70,8	12	50,0
1-5 años	96	81	84,3	86	89,5	81	84,3
6-10	11	11	100,0	10	90,9	10	90,9
11-20	30	28	93,3	24	80,0	30	100,0
21-30	25	22	88,8	20	80,0	24	96,0
31-40	22	18	81,8	17	77,2	20	90,9
41-50	20	18	90,0	16	80,0	18	90,0
51-60	20	20	100,0	16	80,0	17	85,0
más de 60	22	20	90,9	20	90,9	22	100,0
Total	270	230	85,1	226	83,7	234	86,6

ta rápidamente, de manera que en el grupo de 1 a 5 años alcanza ya los valores medios de todos los grupos de edad.

Destaca la importancia de la inmunización frente al tipo 2 en los menores de 1 año (70,8 %). Esta gran frecuencia de los anticuerpos del tipo 2 también se aprecia en el grupo de 1 a 5 años (89,5 %). En los grupos de edades superiores, los tres tipos de anticuerpos se presentan con parecida frecuencia, pues las diferencias que se observan no son estadísticamente significativas.

Si comparamos con los resultados obtenidos en 1960, resulta interesante resaltar las modificaciones observadas en los grupos de edades de 4 a 12 meses, de 1 a 5 años y de 6 a 40 años (*cuadro 5*).

a) En el grupo de menos de 1 año se observa un aumento sensible del porcentaje de sueros con anticuerpos frente a los tipos 1, 2 y 3, sobre todo frente al tipo 2 que se presentaba en el 18,1 % en 1960 y alcanza ahora el 70,8 %. El tipo 1 pasa del 18,1 % al 41,6 %. El tipo 3, que era el más frecuente en 1960, se eleva en menor proporción (de 45,4 % a 50 %). Cerca de la mitad de los sueros estudiados poseen, pues, anticuerpos frente a cada tipo.

b) En el grupo de 1 a 5 años, los porcentajes de anticuerpos frente a cada tipo de poliovirus resultan también más elevados en 1965. El tipo 2 alcanza en este grupo el 89,5 % de los sueros, lo que representa más de un 30 % de aumento sobre los datos de 1960. Los tipos 1 y 3 aumentan su frecuencia sólo en el 9,3 %, pero su frecuencia en 1960 era mucho mayor que la del tipo 2. Destaca, pues, que cada tipo de anticuerpo se halla presente en más del 84 % de todos estos sueros.

c) En el grupo de 6 a 40 años, los porcentajes de inmunización no se modifican sensiblemente.

Por lo tanto, se observa que en 1965 el aumento del grado de inmunización global corresponde fundamentalmente a los menores de 1 año y al grupo de 1 a 5 años, es decir, a los grupos de edad más receptivos, donde se encontraba la mayoría de los casos de poliomiélitis, lo que sin duda es debido a las campañas de vacunación.

2) Atendiendo al número de anticuerpos (*cuadro 6*) que contienen los sueros estudiados (0, 1, 2 ó 3), se comprueba que los sueros desprovistos totalmente de anticuerpos se concentran en los menores de 1 año. Se registran cuatro casos, lo que representa el 16,6 % del grupo

*Cuadro 5. Evolución de la inmunización según la edad. Barcelona, 1960-1965*

Grupos de edad	Porcentaje de sueros con					
	Anticuerpos del tipo 1		Anticuerpos del tipo 2		Anticuerpos del tipo 3	
	1960	1965	1960	1965	1960	1965
4-12 meses	18,1	41,6	18,1	70,8	45,4	50,0
1-5 años	75,0	84,3	58,3	89,5	75,0	84,3
6-40	90,1	89,7	91,8	80,6	91,0	95,4

Cuadro 6. Inmunización según la edad. Barcelona, 1965

Grupos de edad	Número	0 anticuerpos		1 anticuerpo		2 anticuerpos		3 anticuerpos	
		Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje	Número	Porcentaje
4-12 meses	24	4	16,6	8	33,3	3	12,5	9	37,5
1-5 años	96	0	0	12	12,5	15	15,6	69	71,8
6-10	11	0	0	0	0	2	18,1	9	81,8
11-20	30	0	0	2	6,6	4	13,3	24	80,0
21-30	25	1	4,0	2	8,0	2	8,0	20	80,0
31-40	22	0	0	1	4,5	6	27,2	15	68,1
41-50	20	0	0	2	10,0	4	20,0	14	70,0
51-60	20	0	0	0	0	7	35,0	13	65,0
más de 60	22	0	0	0	0	4	18,1	18	81,8
Total	270	5	1,8	27	10,0	47	17,4	191	70,7

y el 80 % de todos los sueros que presentan receptividad a los tres virus poliomiélicos. En los restantes grupos de edad no se registra ningún caso, salvo en el grupo de 21 a 30 años, donde anotamos un suero en el que concurren estas circunstancias (4 % de su grupo y 20 % de todos los sueros sin anticuerpos). Es particularmente destacable el hecho de no haber hallado ningún suero carente de tres anticuerpos en los grupos de 1 a 20 años.

Considerando los sueros que poseen tres anticuerpos, es decir, que se hallan totalmente protegidos, se observa que en el grupo de 4 a 12 meses sólo el 37,5 % reúne estas circunstancias. El porcentaje se eleva rápidamente en las edades posteriores, alcanzando el 71,8 % entre 1 y 5 años, y el 81,8 % entre 6 y 10 años. En las edades superiores, el porcentaje de sueros con tres anticuerpos oscila entre el 65 y el 81,8 %.

Comparando con los resultados obtenidos en 1960 (*cuadro 7*), observaremos:

a) En el grupo de 4 a 12 meses se aprecia un aumento de los sueros con tres anticuerpos que de 0 pasan al 37,5 %. Considerando como muy receptivos los sueros sin anticuerpos o con un solo anticuerpo, y como poco receptivos los que tienen 2 ó 3, aquéllos descienden del 91,9 % al 49,9 %, en tanto que éstos pasan del 9 % al 50 %.

b) En el grupo de 1 a 5 años, se observa el mayor grado de inmunización, que se refleja principalmente en la desaparición de los sueros sin anticuerpos (16,6 % en 1960), y en la existencia de un 71,8 % de sueros poseedores de tres anticuerpos en 1965, mientras sólo el 50 % presentaba esta circunstancia en 1960. Si, de la misma forma que hacíamos en el grupo anterior, valoramos los sueros de personas muy receptivas (0 ó 1 anticuerpos) y poco receptivas (2 ó 3 anticuerpos), los primeros disminuyen su porcentaje desde el 24,9 al 12,5 y los segundos los elevan desde el 75 al 87,4.

c) En el grupo de los 6 a los 40 años no se aprecia modificación alguna.

3) Si consideramos los sueros que carecen de anticuerpos o que presentan uno solo como expresión de los individuos más receptivos, nos interesa conocer la proporción de estos sujetos en los distintos grupos de edad, comparándolos con la totalidad de estos sueros, y no con el número de sueros de cada grupo de edad.

Cuadro 7. Evolución de la inmunización según la edad. Barcelona, 1960-1965

Grupos de edad	Porcentaje de sueros con							
	0 anticuerpos		1 anticuerpo		2 anticuerpos		3 anticuerpos	
	1960	1965	1960	1965	1960	1965	1960	1965
4-12 meses	28,1	16,6	63,8	33,3	9,0	12,5	0	37,5
1-5 años	16,6	0	8,3	12,5	25,0	15,6	50,0	71,8
6-40	1,6	1,1	3,2	5,6	16,3	15,9	78,6	77,2

De la observación del *cuadro 8* se deduce que el 80% de los sueros sin anticuerpos y el 29,6% de los que poseen un solo anticuerpo pertenecen al grupo de 4 a 12 meses de edad. Las dos formas (0 anticuerpos + 1 anticuerpo) representan el 37,5% concentrado en este grupo de edad.

*Cuadro 8. Inmunización según la edad. Barcelona, 1965*

Grupos de edad	Porcentaje de sueros con		
	0 anticuerpos	1 anticuerpo	0 ó 1 anticuerpos
1-12 meses	80,0	29,6	37,5
1-5 años	0	44,4	37,5
6-10	0	0	0
11-20	0	7,4	6,2
21-30	20,0	7,4	9,3
31-40	0	3,7	3,1
41-50	0	7,4	6,2
51-60	0	0	0
más de 60	0	0	0

En el grupo de 1 a 5 años no existe ningún suero sin anticuerpos, como ya señalábamos; sin embargo, en dicho grupo se acumula el 44,4% de los sueros que presentan un solo anticuerpo. El porcentaje sobre el total de sueros con 0 a 1 anticuerpo es así del 37,5%, es decir, el mismo que para el grupo de menos de 1 año. El 75% de la población más receptiva se encuentra, pues, en los menores de 5 años.

Pequeños porcentajes de sueros con 1 anticuerpo se distribuyen en edades superiores, entre los 11 y los 50 años, y sólo un suero sin anticuerpos se presenta en el grupo de 21 a 30 años, lo cual, dado el escaso número de sueros en estas condiciones, representa un 20%. La población más receptiva, es decir, con 0 ó 1 anticuerpos, se encuentra distribuida en pequeños porcentajes (3% al 9%) en los diferentes grupos de edades comprendidos entre 11 y 50 años, lo que, en conjunto, representa que el 25% de esta población más receptiva se halla incluida

entre los 11 y 50 años, indicando la posibilidad de formas paralíticas en estas edades.

Comparando estos resultados con los obtenidos en 1960 para los grupos de 4 a 12 meses, 1 a 5 años y 6 a 40 años, se comprueban (*cuadro 9*) las siguientes modificaciones:

*Cuadro 9. Evolución de la inmunización frente a poliovirus. Barcelona, 1960-1965 (4 meses a 40 años)*

Grupos de edad	Porcentaje de sueros con					
	0 anticuerpos		1 anticuerpo		0 ó 1 anticuerpos	
	1960	1965	1960	1965	1960	1965
4-12 meses	50,0	80	70	32	62,5	40
1-5 años	33,3	0	10	48	18,7	40
6-40	16,6	20	20	20	18,7	20

a) El grupo de menos de 1 año representaba, en 1960, el 62,5 % de toda la población muy receptiva, frente al 40 % en la actualidad.

b) En el grupo de 1 a 5 años, aparte del hecho ya repetidamente destacado, de la ausencia de sueros sin anticuerpos en 1965 (frente a la localización de un 33,3 % de todos ellos en este grupo, en 1960), destaca que el porcentaje de sueros de 0 a 1 anticuerpos aumenta en relación con 1960. Es lógico que así sea, porque anteriormente el grupo de menos de 1 año era el principal acaparador de estos casos. Al no ocurrir así en la actualidad, los porcentajes de estos sueros se distribuyen regularmente entre estos dos primeros grupos de edad.

c) Por encima de los 6 años no existe variación significativa con los resultados de 1960.

4) Estudiando el porcentaje de sueros que carecen de algún anticuerpo podemos conocer las personas que son receptivas a algún tipo de virus, es decir, que sólo presentan una protección parcial.

De la observación del *cuadro 10* se deduce que, salvo el grupo de 4 a 12 meses, en el que el porcentaje de estos sujetos es elevado, en

el resto de los grupos, incluido el de 1 a 5 años, los sueros que carecen de algún anticuerpo se presentan en el 18 % de los casos o más. Este hecho es de particular importancia porque explica cumplidamente la posibilidad de casos de poliomielitis en todas las edades, incluidas las más avanzadas.

Cuadro 10. Porcentaje de sueros. Barcelona, 1965

Grupos de edad	Ningún anticuerpo	Carecen de algún anticuerpo	Poseen algún anticuerpo	Tres anticuerpos
4-12 meses	16,6	62,4	83,3	37,5
1-5 años	0	28,1	100,0	71,8
6-10	0	18,1	100,0	81,8
11-20	0	19,9	100,0	80,0
21-30	4,0	19,9	96,0	80,0
31-40	0	31,8	100,0	68,1
41-50	0	29,9	100,0	70,0
51-60	0	34,9	100,0	65,0
más de 60	0	18,1	100,0	81,8

Comparando con los resultados obtenidos en 1960 (*cuadro 11*) se observa que por debajo de los 5 años el porcentaje de estos sueros que carecen de algún anticuerpo se ha reducido notablemente, permaneciendo sin variación por encima de los 5 años.

5) Estudiando la proporción de personas que presentan algún anticuerpo para cada grupo de edad, se puede conocer el momento en que se inician los contactos con los poliovirus, y sobre todo, determinar la edad en que la mayoría de la población ha entrado en contacto con algún tipo de poliovirus, es decir, aquella en que del 95 % al 100 % de la población presenta algún tipo de anticuerpos (*cuadro 11*).

Se observa que en 1965, ya el grupo de 1 a 5 años presenta un 100 % de sujetos poseedores de algún anticuerpo, mientras que en 1960 esta circunstancia se presentaba a partir de los 6 años de edad, lo que indudablemente es debido a las campañas masivas de vacunación.

Cuadro 11. Evolución de la inmunización frente a poliovirus. Barcelona, 1960-1965 (4 meses a 40 años)

Grupos de edad	Porcentaje de sueros que			
	Carecen de algún anticuerpo		Poseen algún anticuerpo	
	1960	1965	1960	1965
4-12 meses	100,0	62,4	72,7	83,3
1-5 años	50,0	28,1	83,3	100,0
6-40	21,3	22,7	98,3	98,8

### RESUMEN Y CONCLUSIONES

Los resultados del estudio realizado en Barcelona durante 1965 pueden resumirse en las siguientes conclusiones.

1) Aplicando la reacción de seroneutralización, a la determinación de anticuerpos frente a los poliovirus, en el suero de 270 personas de 4 meses a más de 60 años de edad, se obtienen los siguientes *datos globales*:

Alrededor del 85 % de los sueros examinados presentan anticuerpos frente a cada uno de los tres tipos de poliovirus; el 1,8 % de los casos no presenta ningún anticuerpo; el 10 % presenta un solo anticuerpo; el 17,4 % presenta dos, y en el 70,7 % están presentes los tres anticuerpos.

Estas cifras son superiores a las obtenidas por Pumarola y González-Fusté, en Barcelona, en 1960, observándose un incremento del 1,7 % al 6,3 % de personas con anticuerpos frente a cada poliovirus, en las edades comparadas (de 0 a 40 años). La población sin anticuerpos se ha reducido a una tercera parte y la población con tres anticuerpos ha aumentado en un 6 %. Este aumento de la inmunización global de la población obedece indudablemente a las campañas de vacunación en masa de los últimos años.

2) Si determinamos la edad en que prácticamente la totalidad de

la población ha entrado en contacto con algún tipo de poliovirus observamos que esta circunstancia resulta muy temprana a consecuencia de la vacunación. Antes del año de edad, las cifras de niños que poseen algún anticuerpo es ya un 10,6 % superior a la obtenida en 1960 (83,3 %, frente al 72,7 %). A partir del año de edad se encuentra en 1965 un 100 % de sueros con algún anticuerpo, mientras que en 1960 sólo ocurría este hecho en el 83,3 %.

3) La *población receptiva* se conoce por la consideración de los sueros que carecen de uno o varios anticuerpos. Podemos dividirla en tres grupos:

- a) Sueros sin anticuerpos, o receptividad total,
- b) Sueros con un anticuerpo, o receptividad parcial, y
- c) Sueros con dos anticuerpos; en este grupo dada la relación antigénica entre los tipos 1 y 2 de poliovirus, admitida por la mayoría de autores, la receptividad parcial es cuestionable.

a) De manera conjunta, el grupo que carece de anticuerpos se concentra entre los menores de 1 año (80 %). Sólo ocurre por encima de esta edad algún caso de carácter puramente esporádico.

b) Las personas con 1 anticuerpo se concentran en su mayoría entre los menores de 5 años (74 %). El 26 % restante se encuentra entre los mayores de 5 años (grupo de 6 a 50 años), distribuyéndose en porcentajes del 3 al 7 para cada grupo de edad.

De la comparación de la población receptiva con la observada en 1960, resalta la influencia de la vacunación en el grado de inmunización en los grupos de menos de 1 año y de 1 a 5 años. Desde los 6 a los 40 años, la población receptiva no se modifica en relación con 1960.

Los hechos señalados indican que es necesario intensificar la vacunación en los menores de 1 año, y que, por otra parte, en los diferentes grupos de edades comprendidos entre 6 y 50 años existen pequeños porcentajes de población con 0 ó 1 anticuerpos, por lo que la vacunación como medida individual está indicada en todas las edades.

## SUMMARY

The authors have studied the degree of immunization against poliovirus of the Barcelona population during 1965, by the determination of specific antibodies in the serum of 270 people of different age groups.

The results show that 85 % have antibodies against each one of the three serotypes of poliovirus; 1,8 % have no antibodies, 10 % have one antibody, 17,4 % two antibodies and 70,3 % the three antibodies.

Comparison of these results with previous ones (1960), shows an increase of the degree of immunization, specially marked in the age groups (0-5 years old) affected by the mass vaccination campaign, the primoinfection become sooner (83,3 % in the first year of life), the percentage of population with no antibodies has decreased 66, and the population with three antibodies has increased 6 %. The other age groups show no modification.

## BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, C. 1939. The experimental transmission of poliomyelitis to the eastern rat *Sigmodon hispidus hispidus*. Public Health Rep., 54, 1.719.
2. ARMSTRONG, C. 1939. Successful transfer of Lansing strain of poliomyelitis virus from cotton rat to the white mouse. Public Health Rep., 54, 2.302.
3. BARSKI, G., y LEPINE, P. 1954. Microméthode de seroneutralisation de la poliomyélite: Emploi de cultures cellulaires sur plaques moulées de matière plastique. Ann. Inst. Pasteur, 86, 693.
4. BELL, E. J. 1948. Experimental studies of variables in neutralization tests with Lansing poliomyelitis virus. Am. J. Hyg., 48, 381.
5. EAGLE, H. 1955. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma, strain KB Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 89, 362.
6. LEDINKO, N.; RIORDAN, J. T., y MELNICK, J. L. 1952. Multiplication of poliomyelitis viruses in tissue cultures of monkey testes. I. Growth curves of type I (Brunhilde) and type II (Lansing) strains and description of a quantitative neutralization test. Am. J. Hyg., 55, 323.
7. LEPINE, P.; BARSKI, G., y CORNEFERT, F. 1956. Resultats comparatifs des seroneutralisations et des titrages de virus poliomyélique executées par micro-méthode sur plaques en matière plastique et par le méthode classique en tubes. Ann. Inst. Pasteur, 91, 427.
8. LEPINE, P.; ROGER, F., y ROGER, A. 1959. La réaction cinétique de seroneutralisation des virus poliomyélitiques. Bull. Organ. Mondiale Santé, 20, 563.

9. LEPINE, P.; SLIZEWICK, P.; DANIEL, Ph., y PACCAUD, M. 1956. Cultures cellulaires dans un milieu utilisant l'hydrolysat de caseine comme source d'acides aminés. *Inst. Pasteur*, 90, 654.
10. LIPTON, M. M., y STEIGMAN, A. J. 1955. Simplified colorimetric test for poliomyelitis virus and antibody. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 88, 144.
11. MELNICK, J. L., y OPTON, E. M. 1956. Assay of poliomyelitis neutralizing antibody in disposable plastic panels. *Bull. Organ. Mondiale Santé*, 14, 129.
12. PÉREZ GALLARDO, F. 1962. Epidemiología de la poliomiélitis en España. *Rev. Sanidad Hig. Pública*, 36, 501.
13. PUMAROLA, A., y GONZÁLEZ-FUSTÉ, F. 1961. Investigación epidemiológica sobre la poliomiélitis. *Med. Clín.*, 36, 29.
14. PUMAROLA, A.; SÁNCHEZ-VILLARES, E., y ESCRIBANO, R. 1962. Inmunización espontánea de la población de Salamanca frente a poliovirus. *Bol. Soc. Castilla Asturias León Pediat.*, 3, 329.
15. ROBERTSON, H. E.; BRUNNER, K. T., y SYVERTON, J. T. 1955 Propagation of poliomyelitis viruses. VII, pH change of HeLa cells cultures for assay. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 88, 119.
16. RODRÍGUEZ-TORRES, A. 1963. Transmisión placentaria de anticuerpos neutralizantes antipoliomielíticos. *Med. Trop. (Madrid)*, 39, 23.
17. SALK, J. E.; YOUNGNER, J. S., y WARD, E. N. 1954. Use of color change of phenolred as the indication in titrating poliomyelitis virus or its antibody in a tissue cultures system. *Am. J. Hyg.*, 60, 214.
18. SANCHIS-BAYARRI, V. 1961. Etude de l'immunisation spontanée contre la poliomyélite a Valence. *Ann. Inst. Pasteur*, 100, 531.

Depósito legal: M. 702 - 1958

---

ART. GRÁF. REYES.—Jerónimo Lorente, 15. MADRID