
VOLUMEN 26. 1973

ABRIL - SEPTIEMBRE. NUMEROS 2 - 3

Microbiología Española

Revista

*del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología
y de la Sociedad Española de Microbiología*



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

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

Vicedirector: Dr. David Vázquez, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Vocales: Dr. Fernando Baquero, Dr. Antonio Portolés, Prof. Agustín Pumarola, Dr. Miguel Rubio, Dr. Fernando Ruiz-Falcó y Dr. Gonzalo Sierra.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Difusión y Publicaciones, 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, 300 PTA; extranjero, 400 PTA

Número: España, 85 PTA; extranjero, 120 PTA

RECOMENDACIONES A LOS AUTORES

“Microbiología Española” publicará fundamentalmente trabajos y notas de investigación, dentro del campo de la Microbiología, y también trabajos doctrinales que se estimen de interés especial. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquiera otra revista. Los que aparezcan en “Microbiología Española” podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, deberán estar escritos a máquina, en papel de tamaño holandesa, por una sola cara, a doble espacio y márgenes de 2 cm a cada lado como mínimo. Los dibujos, con tinta china y en papel vegetal; las cifras, letras y leyendas, a lápiz. Para orientación de los autores, las dimensiones de la caja son 18 × 11,5 cm.

En la cabecera de la primera página se harán constar: Centro en que se ha realizado el trabajo, título (conciso), nombre del autor (o inicial) en letras minúsculas y apellido, en mayúsculas. Al pie de la página deberá figurar la dirección postal del autor.

En líneas generales, los trabajos de investigación constarán de: Introducción, Material y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Resumen en la otra lengua y Bibliografía. Las notas y trabajos doctrinales se redactarán con arreglo a su naturaleza.

Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. Cuando se adopten abreviaturas no corrientes deberán advertirse en el texto. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas correspondientes. Los datos se presentarán en forma de cuadro o de figura; cuadros y figuras, independientemente, estarán numerados y citados en el texto.

El resumen en la otra lengua, de un máximo de doscientas palabras, deberá contener el título del trabajo, un breve esquema del mismo y las conclusiones (abreviadas, en su caso).

La bibliografía se reducirá a la que esté directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, se ajustarán al siguiente orden:

Revistas: apellido del autor, inicial del nombre, año, título del trabajo, nombre abreviado de la revista (según Chemical Abstracts), número del tomo o volumen y páginas inicial y final.

Libros: apellido del autor e inicial del nombre [en su caso, del recopilador (“editor”)], año, título de la obra, tomo o volumen, capítulo (en su caso), página, editorial y población.

Los autores recibirán pruebas que deberán devolver en el plazo máximo de diez días para los residentes en España, y en el de veinte, para el extranjero. Transcurridos dichos plazos sin devolución de pruebas, se retirará el trabajo del turno de publicación, y a los seis meses de la fecha de envío se anulará. Las modificaciones hechas por el autor que excedan del 2 % del texto serán abonadas por él.

Cada autor tendrá derecho a treinta separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

La responsabilidad de los conceptos escritos corresponde a los autores.

Los trabajos se enviarán al Secretario de “Microbiología Española”, Joaquín Costa, 32, Madrid-6. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo Rector de la Revista.

INDICE

	Página
Partículas tubulares en trébol infectado con dos virus, por <i>M. Rubio-Huertos, Amparo Vela y J. R. Díaz-Ruiz</i>	59
Modificación del método del <i>Phycomyces blakesleeanus</i> para investigación de vitamina B ₁ y adaptación para mostos, vinos y levaduras, por <i>Pilar Aznar</i>	69
Estudio comparativo de técnicas serológicas de precipitación para la detección de polisacárido de meningococos, por <i>J. Casal, Pilar Pérez-Breña y Cecilia Martín-Bourgon</i> ...	85
Prueba de inhibición metabólica para medir anticuerpos frente a <i>Neisseria meningitidis</i> , por <i>J. Casal y Cecilia Martín-Bourgon</i>	99
Reunión sobre Microbiología Hospitalaria. Resúmenes de Comunicaciones	111
Bibliografía, por <i>L. Vilas, F. Ruiz-Falcó y M. Rodríguez-Rebollo</i>	131

CONTENTS

	Page
Tubular particles in <i>Trifolium incarnatum</i> infected with two viruses, by <i>M. Rubio-Huertos, Amparo Vela and J. R. Díaz-Ruiz</i>	59
Modification of the <i>Phycomyces blakesleeanus</i> method for investigación of vitamin B ₁ , by <i>Pilar Aznar</i>	69
A comparative study of precipitating serological techniques for the detection of meningococcal polysaccharide, by <i>J. Casal, Pilar Pérez-Breña and Cecilia Martín-Bourgon</i>	85
Metabolic inhibition test for the measurement of antibody to <i>Neisseria meningitidis</i> , by <i>J. Casal and Cecilia Martín-Bourgon</i>	99
Meeting on Hospital Microbiology. Summary of Communications	111
Bibliography, by <i>L. Vilas, F. Ruiz-Falcó and M. Rodríguez-Rebollo</i>	131

INSTITUTO «JAIIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA
SECCION DE VIRUS VEGETALES

PARTICULAS TUBULARES EN TREBOL INFECTADO CON DOS VIRUS

por

M. RUBIO-HUERTOS, AMPARO VELA y J. R. DIAZ-RUIZ

INTRODUCCION

Durante la continuación de un trabajo sobre virus que atacan a las plantas leguminosas en España (1), al estudiar una serie de plantas de trébol con síntomas de virosis, encontramos, junto a dos virus ya conocidos, como el Mosaico amarillo de la judía y otro no conocido, del tipo Rhabdo, que hemos descrito en otro trabajo (5), unas partículas tubulares que por sus características no se corresponden con la de ningún virus descrito hasta ahora infectando leguminosas. El estudio de estas partículas y su localización en la célula huésped así como sus posibles relaciones con otros virus constituyen el tema de este trabajo.

MATERIAL Y METODOS

Plantas

Las plantas estudiadas fueron tréboles rojos, *Trifolium incarnatum*, mostrando Mosaico y deformación de las hojas, recogidas en Fabero (León) y transplantadas a tiestos que mantuvimos en invernadero.

Pruebas de transmisión

Se realizaron inoculaciones mecánicas usando carborundo como abrasivo, a plantas sanas de trébol, *Vicia faba* L. y *Phaseolus vulgaris* L.

Purificación

Hemos empleado el método de butanol-cloroformo, de Steere (4).

Microscopia electrónica

Para tinción negativa hemos empleado ácido fosfotúngstico al 2 %, pH = 7, en tampón de fosfato. La tinción se ha hecho de una suspensión del purificado y de la savia directamente por el método "dip", de Brandes.

Cortes ultrafinos: piezas de hojas de 3 mm aproximadamente se fijaron en glutaraldehído al 4 %, en tampón de fosfato 0,05 M, durante 2 h, a 4 °C; se lavaron bien las piezas en el tampón (6 cambios de tampón en 3 h) y se posfijaron en tetraóxido de osmio al 2 %, en tampón, durante 2 h, a 4 °C. Los tejidos, una vez fijados, se deshidrataron en una serie gradual de acetonas de concentración creciente y se incluyeron en durcupan. Las secciones ultrafinas se realizaron en un ultramicrotomo LKB, utilizando cuchillas de vidrio y fueron teñidas con citrato de plomo. Los cortes fueron observados con un microscopio Siemens Elmiskop I.

RESULTADOS

Las observaciones nos demostraron que las plantas estaban infectadas por dos virus y además contenían partículas tubulares.

Los resultados concretos se exponen a continuación.

Transmisión

Por inoculación mecánica se pudo transmitir fácilmente el virus Mosaico amarillo de la judía, pero no el virus de tipo Rhabdo ni las partículas tubulares.

Purificación

El purificado dio por espectrofotometría de ultravioleta la curva de absorción de nucleoproteína, pero en dicho purificado solamente se

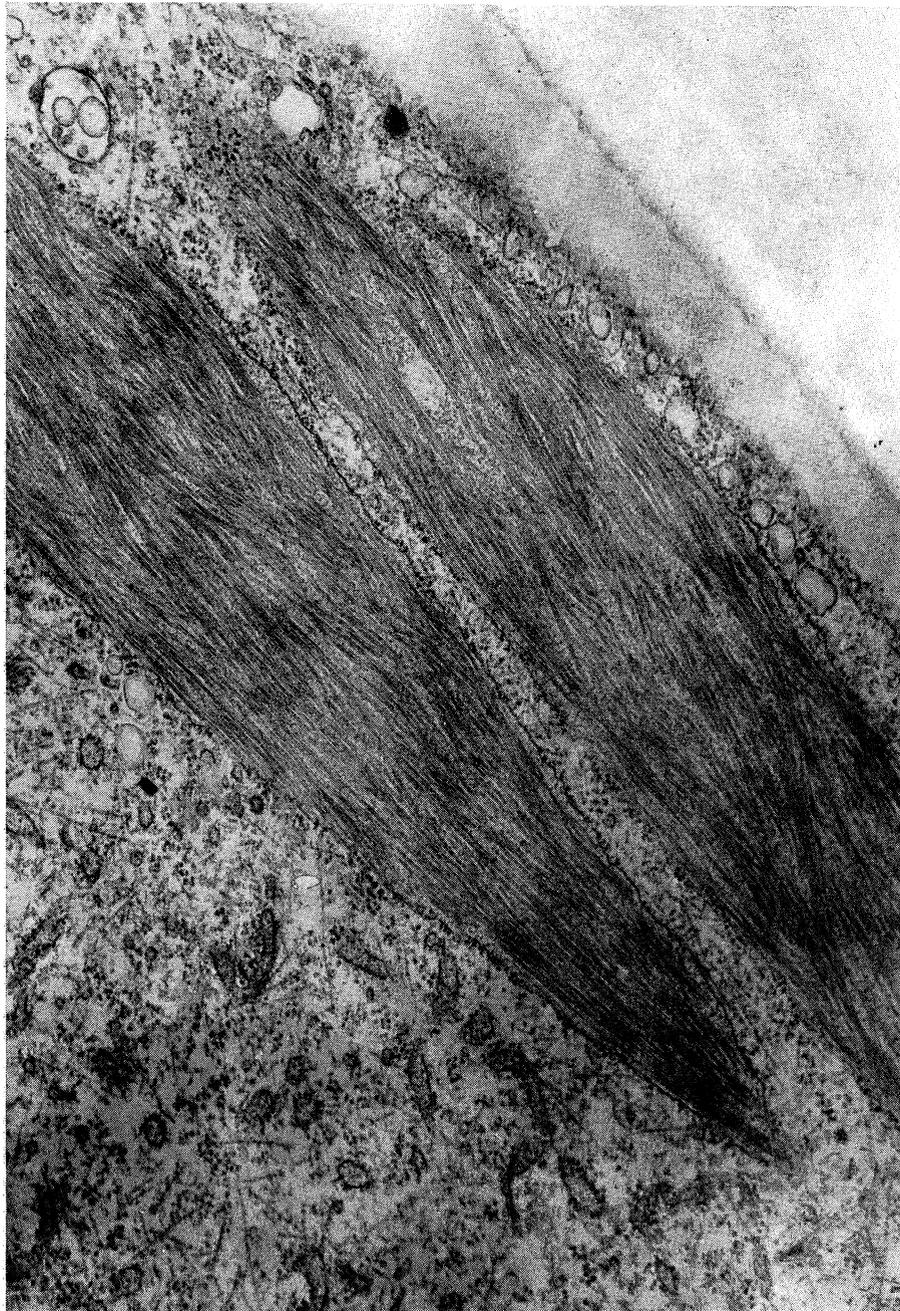


Figura 1. Dos masas de partículas tubulares rodeadas de una membrana en el citoplasma. Dentro del citoplasma se pueden ver partículas del Mosaico amarillo de la judía, dispersas entre los elementos celulares. × 33.000

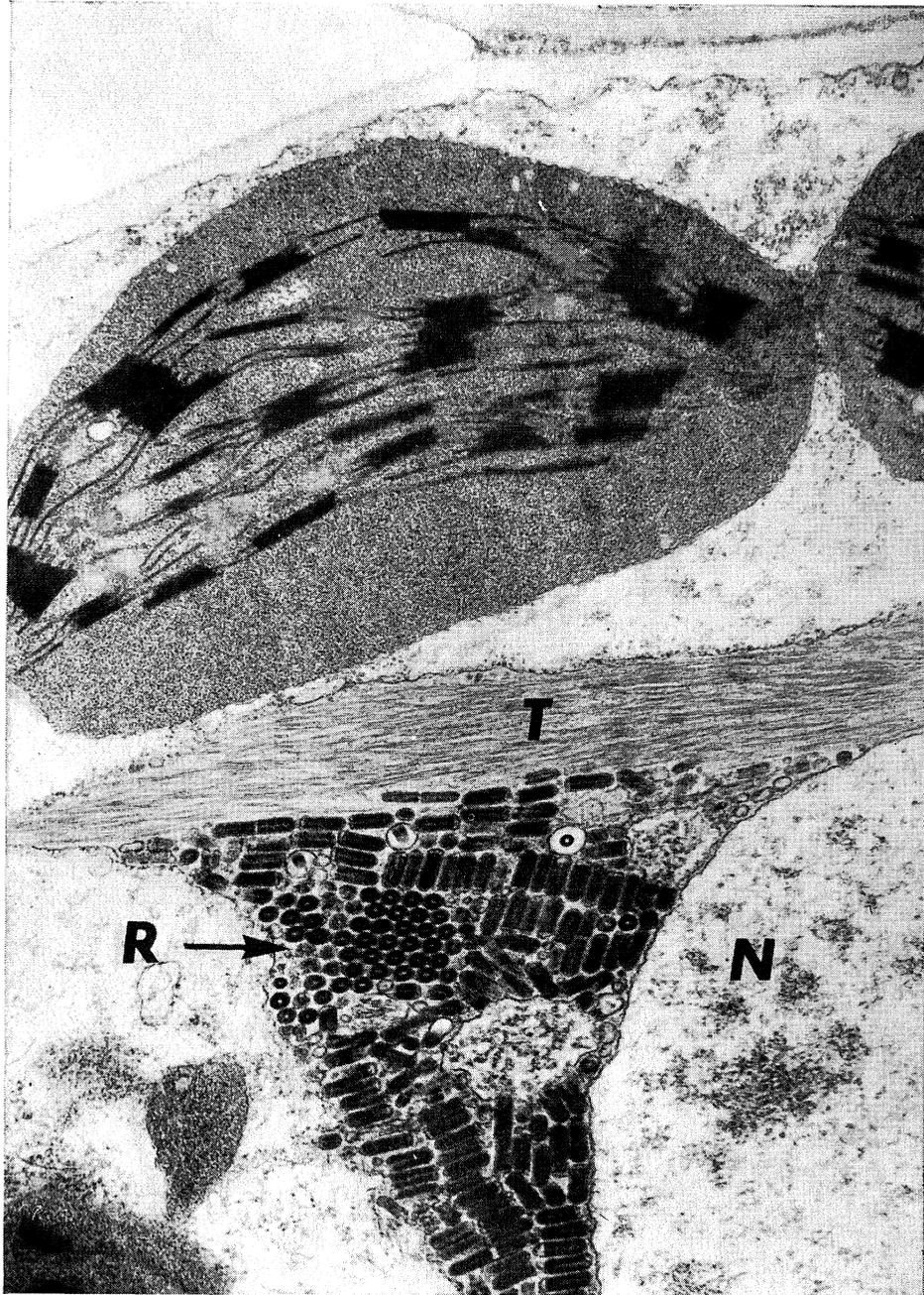


Figura 2. Partículas tubulares en el espacio perinuclear de la célula, junto con partículas de virus Rhabdo (N, núcleo; T, partículas tubulares; R, partículas Rhabdo). $\times 26.400$

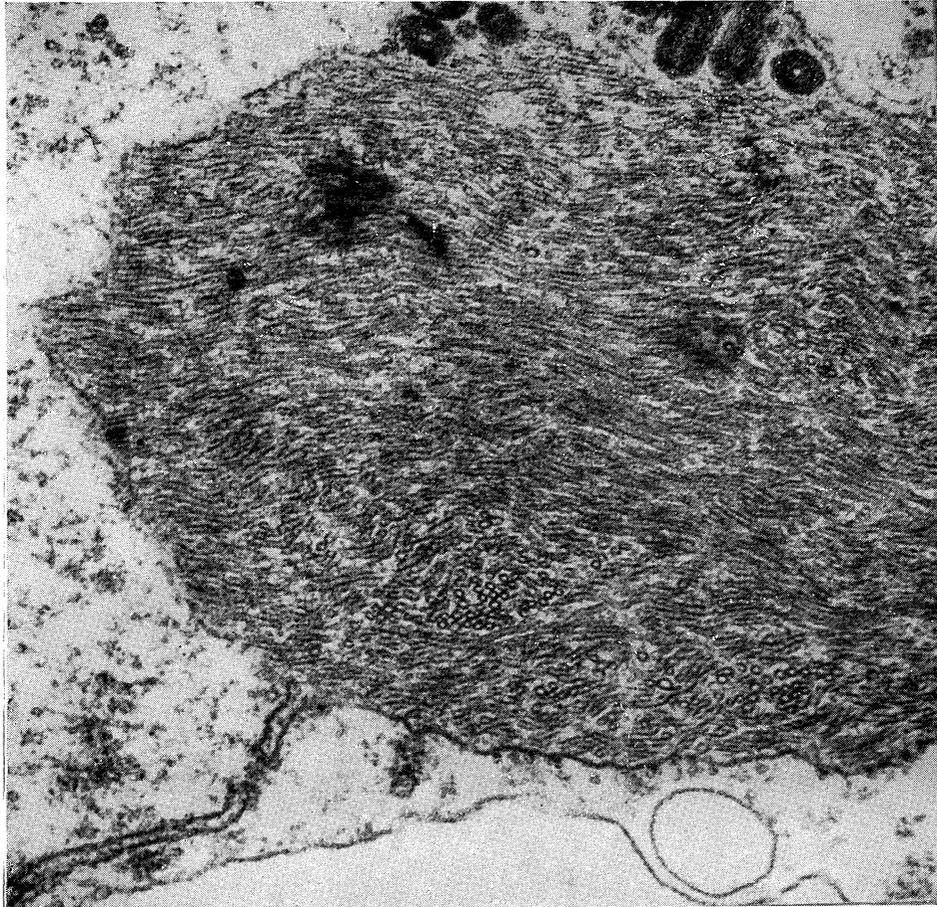


Figura 3. Masas de partículas tubulares rodeadas por una membrana en conexión con el retículo endoplásmico. × 88.000

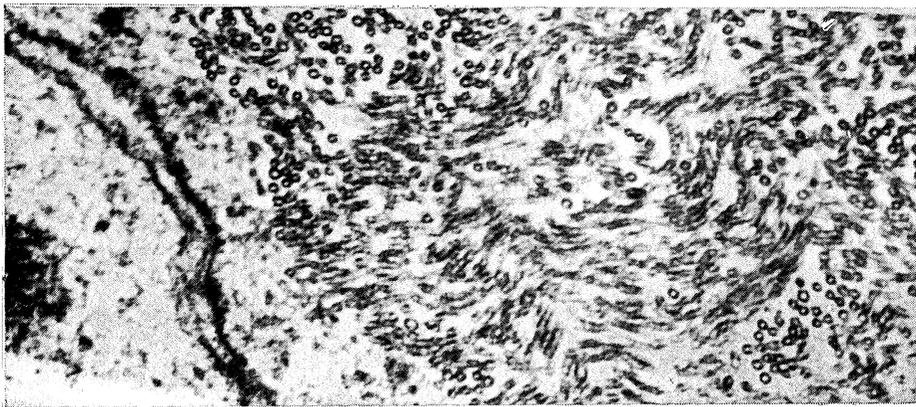


Figura 5. Algunas partículas tubulares cortadas transversalmente. × 96.000

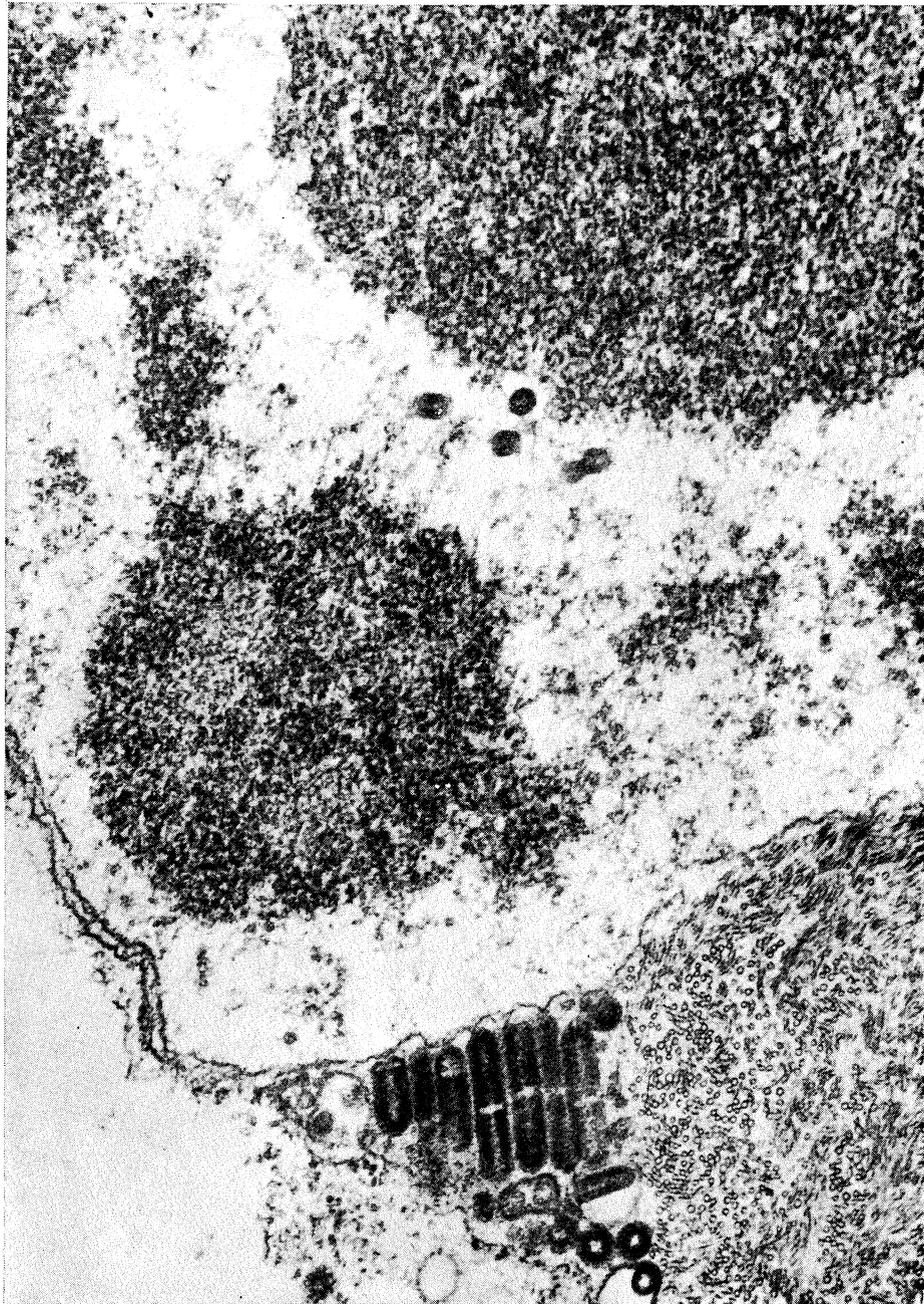


Figura 4. Parte del núcleo mostrando nucleocápsidas del virus Rhabdo en su interior y partículas completas del virus Rhabdo junto con partículas tubulares en el espacio perinuclear. × 66.000

pudieron apreciar partículas del virus Mosaico amarillo de la judía, al examinarlo por microscopia electrónica en tinción negativa.

Cortes ultrafinos

En los cortes ultrafinos se puede observar la coexistencia en las mismas células de los dos virus Mosaico amarillo de la judía y el de tipo Rhabdo con las partículas tubulares.

El virus Mosaico amarillo de la judía forma inclusiones cristalinas en el núcleo y en el citoplasma de las células infectadas e inclusiones del tipo de virus Y de la patata en el citoplasma, como ha sido ya descrito por Weintraub y colaboradores (6). También se observaron partículas aisladas del virus en el citoplasma de la célula huésped (*figura 1*).

El virus de tipo Rhabdo se encuentra principalmente en los espacios perinucleares de las células huésped, aunque también puede encontrarse en el citoplasma, pero rodeado de una membrana. Este virus parece que se forma en el interior del núcleo, en el nucleoplasma de la célula huésped, donde aparecen las nucleocápsidas que al salir al espacio perinuclear se rodean de una membrana externa, según ha sido descrito por Vela y Rubio-Huertos (5) (*figuras 2-4*), y sucede en otros virus de este tipo (1-2)..

Las partículas tubulares miden 15 nm de diámetro, y su longitud no ha podido ser determinada, pues se encuentran formando grandes hacina- mientos o masas en las que no se puede distinguir bien dónde acaban y dónde empiezan las partículas, aunque parecen ser mayores de 400 nm.

Estas partículas se encuentran principalmente en los espacios perinucleares, generalmente asociadas con las partículas del virus de tipo Rhabdo (*figura 2*) y con glóbulos de lípidos; son huecas, es decir, son verdaderos túbulos, como se puede apreciar en cortes transversales (*figuras 3 y 5*) y aparecen también en el citoplasma solas o acompañadas por partículas del tipo Rhabdo formando grandes masas y siempre rodeadas de una membrana a veces conectada con el retículo endoplásmico, y cuyo origen es perinuclear con toda probabilidad (*figura 3*).

Las partículas tubulares no se tiñen como la mayoría de los virus ve- getales de forma anisométrica, en los cuales la cápsida se tiñe de una mane- ra homogénea, tomando un tinte grisáceo que la distingue del citoplasma, sino que se tiñen los bordes fuertemente, quedando apenas sin contraste

la parte interna y solamente aparecen de color grisáceo cuando se encuentran en capas superpuestas.

DISCUSION

Las partículas tubulares, anteriormente descritas, no presentan las características de tinción que poseen normalmente las partículas de virus isométricas y no hemos conseguido su transmisión por inoculación mecánica, ni su purificación por el método del butanol-cloroformo. Estos hechos parecen indicar que dichas partículas no corresponden a viriones, es decir, a partículas de virus; sin embargo, no se encuentran en plantas sanas de *Trifolium incarnatum* cultivadas en invernadero, y su forma y dimensiones aproximadas, así como su localización en las células de las plantas enfermas, sí corresponden a partículas de virus.

De estos hechos, se pueden sacar dos deducciones: 1.^a) Es posible que se trate de partículas de un virus que ni es transmisible por inoculación mecánica, como existen muchos y concretamente el virus de tipo Rhabdo, que coexiste en las células de la hoja con las partículas tubulares, ni sea tampoco posible su purificación por el método de Steere (4), como pasa también con otros virus, ó 2.^a) Que estas partículas tubulares estén relacionadas con el ciclo vital del virus Rhabdo y constituyan una de las fases de formación de las partículas baciliformes de dicho virus.

Esta segunda deducción no parece muy probable, puesto que el virus Rhabdo se forma dentro de los núcleos de las células infectadas y las partículas tubulares no aparecen nunca dentro de los núcleos y, además, en las plantas infectadas por ambos tipos de partículas, las tubulares solamente se encuentran en los tejidos foliares, mientras que las partículas baciliformes del virus Rhabdo se encuentran también en los tejidos de los nódulos producidos por *Rhizobium* en la raíz de dichas plantas. Por otro lado, el Prof. Peter E. Lee, de la Universidad de Ottawa (Canadá), que conocía el desarrollo de este trabajo, nos ha comunicado que ha encontrado partículas tubulares en infecciones producidas por un virus de tipo Rhabdo, lo que parece indicar que existen relaciones de algún género (quizás un insecto vector común) entre ambas clases de partículas.

Tras estas consideraciones, nosotros nos inclinamos a la primera deducción, es decir, que se trate de un virus que necesite un vector animal

para su transmisión. Actualmente estamos tratando de encontrar dicho vector.

RESUMEN

En plantas de trébol, *Trifolium incarnatum*, infectadas con el virus Mosaico amarillo de la judía y otro virus del tipo Rhabdo, descrito en un trabajo anterior, hemos encontrado unas partículas de aspecto vírico, alargadas, flexuosas, de 15 nm de ancho y longitud no determinada, que se encuentran localizadas, formando paquetes apretados, en el espacio perinuclear de las células infectadas; estas masas de partículas tubulares también aparecen en el citoplasma, rodeadas siempre de una membrana.

Las partículas tubulares no son transmisibles por inoculación ni se encuentran en los tejidos nodulares de las raíces de las plantas infectadas. En plantas sanas de *Trifolium incarnatum* no se encuentran estas partículas.

Los autores creen que se trata de un virus no descrito que necesita un insecto vector para su transmisión.

SUMMARY

Tubular particles in Trifolium incarnatum infected with two viruses

In ultrathin sections of *Trifolium incarnatum* foliar tissue showing symptoms of a virus disease, long tubular particles 15 nm wide were found in the perinuclear spaces of the infected cells and also in the cytoplasm forming big bundles of particles bounded by a membrane, these particles are not transmitted by mechanical inoculation.

The plants studied were also infected with bean yellow mosaic virus and another virus of the Rhabdo type.

The relationships between these different kind of particles are discussed. The authors believe that these tubular particles belong to a virus possibly transmitted by insects.

BIBLIOGRAFIA

1. MCLEOD, R.; BLACK, L. M., and MOYER, R. H. 1966. The fine structure and intracellular localization of potato yellow dwarf virus. *Virology*, 29, 540-52.
2. RUBIO-HUERTOS, M., and BOS, L. 1969. Morphology and intracellular localization of bacilliform virus particles associated with the clover enation disease. *Neth. J. Plant Pathol.*, 75, 329-37.
3. RUBIO-HUERTOS, M.; SANTAOLALLA, M., and MORENO, R. 1967. Clasificación y distribución de algunos virus de leguminosas en España. *An. Edafol. Agrobiol.*, 26, 763-79.
4. STEERE, R. L. 1959. The purification of plant viruses. *Advan. Virus Res*, 6, 1-75.
5. VELA, A., and RUBIO-HUERTOS, M. Bacilliform particles within infected cells *Trifolium incarnatum*. *Phytopathol. Z.* (en prensa).
6. WEINTRAUB, M., and RAGETLI, H. W. J. 1966. Fine structure of inclusions and organelles of *Vicia faba* infected with bean yellow mosaic virus. *Virology*, 28, 290-302.

INSTITUTO "JAIME FERRAN", DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA GENERAL
SECCION DE LEVADURAS

MODIFICACION DEL METODO
DEL *PHYCOMYCES BLAKESLEEANUS* PARA
INVESTIGACION DE VITAMINA B₁ Y ADAPTACION
PARA MOSTOS, VINOS Y LEVADURAS

por

PILAR AZNAR

INTRODUCCION

Los métodos que se han propuesto para el análisis de vitamina B₁ se pueden clasificar en biológicos, microbiológicos y físico-químicos.

Los métodos biológicos, que utilizan animales de laboratorio, son muy costosos y requieren mucho tiempo, por lo que son poco adecuados para las investigaciones en serie.

Las técnicas por vía química, si bien son muy rápidas, no son tan sensibles y específicas como los métodos biológico-microbianos.

El método físico-químico que más se emplea y por nosotros estudiado, es el del tiocromo, propuesto por Jansen (13) y modificado luego de distintas maneras por otros autores, para la medición física de la fluorescencia y la determinación de la vitamina en diversas sustancias.

Este método del tiocromo se funda en medir el producto de oxidación de la vitamina B₁, o sea, el tiocromo, por su intensa fluorescencia azul, en luz ultravioleta.

Barger (2) observó que oxidando la vitamina B₁ con ferricianuro potásico en solución alcalina se transforma en un cuerpo que posee una

intensa fluorescencia azul, el cual fue denominado "tiocromo" por Kuhn (16), quien lo había aislado anteriormente de la levadura.

Jansen (13) fue el primero que utilizó la formación de este tiocromo fluorescente para el análisis cuantitativo de la vitamina B₁.

Como un exceso de ferricianuro destruye rápidamente el tiocromo, es preciso que la cantidad de aquél sea proporcionada a la de vitamina existente.

Jansen (13) comprobó que la cantidad de solución de ferricianuro desempeña un papel importante y que un exceso de ella puede ser perjudicial al tiocromo.

Karrer y Kubli (14) opinan que es más importante evitar el uso de una cantidad demasiado escasa, ya que, cuando existen otras sustancias fácilmente oxidables, pueden consumir todo o parte del oxidante y quedar poco de él para la oxidación de la vitamina B₁. Como en las sustancias a investigar se desconoce la cantidad de vitamina B₁, es necesario hacer diversos tanteos.

Por otra parte, la vitamina B₁ es también muy sensible a los álcalis, por lo que el oxidante debe añadirse antes que el álcali.

Otto y Rühmekorb (19) estudian e indican que la intensidad de la fluorescencia depende de la alcalinidad.

El tiocromo fluorescente se extrae con alcohol isobutílico y se mide la fluorescencia.

Jansen (12) hace esta medición con el fluorómetro de Cohen, provisto de una fotocélula.

Según Karrer y Kubli (14), las cifras obtenidas con el método de Jansen son a menudo demasiado altas, lo que atribuyen a que frecuentemente existen otras sustancias fluorescentes que actúan también sobre la fotocélula y simulan una cantidad de tiocromo o vitamina B₁ mayor que la que hay en la realidad.

En las diversas técnicas existen muchos datos contradictorios que revelan que la medición de la fluorescencia del tiocromo ofrece muchas dificultades, que perjudican a la exactitud del método.

Por otra parte, es necesario que la tiamina quede libre de sustancias extrañas con fluorescencia perturbadora. La mayoría de los autores lo realizan con tratamiento de adsorbentes (p. ej., franconita o tierra de batán), los cuales retienen la tiamina, pero no las impurezas. Pero se ha demostrado, y nosotros hemos comprobado, que no se adsorbe toda

la vitamina y tal vez en el tratamiento ulterior del producto tampoco se transforma toda ella en tiocromo, dando resultados bajos.

Con este método la vitamina B₁ se puede determinar directamente en los extractos, p. ej., de levadura de cerveza o de cáscara de arroz, pero en los productos menos ricos en ella es preciso concentrarla primero por adsorción con tierra de batán o tierra esméctica. Pero como ya hemos indicado, no toda la vitamina es adsorbida ni transformada totalmente en tiocromo, dando resultados no satisfactorios.

Pequeñas cantidades de tiamina se pueden determinar, pero con reducción en la precisión y exactitud del método.

Este método es aplicable para sustancias ricas en vitamina B₁, pero no para las que contienen pequeñas cantidades de esta vitamina, p. ej., en los vinos.

Las técnicas microbiológicas poseen las ventajas de rapidez, sencillez, sensibilidad y exactitud, con un pequeño coste, por lo que son las comúnmente empleadas (21-22). Entre estos métodos biológico-microbianos se encuentran el de Schopfer (27-28), utilizando el hongo *Phycomyces blakesleeanus*, el de Sarett y Cheldelin (5), utilizando *Lactobacillus fermenti*, y el de A. Schultz y colaboradores (29-30), con levadura.

El de Sarett y Cheldelin (5), utilizando *Lactobacillus fermenti* [empleado por Peynaud y Lafourcade (20)], se funda en el crecimiento del *Lactobacillus*, que en determinadas condiciones es proporcional a la cantidad de vitamina presente. El crecimiento del *Lactobacillus* es medido por nefelometría. Este método sólo es aplicable para los medios claros, así, mosto de uva, vinos blancos o rosados, pero no es satisfactorio para medios muy coloreados o turbios, así, para vinos tintos, que además del color provocan una turbidez y floculación con el medio de base.

El método de Schultz y colaboradores (29-30), con levadura [empleado por Hidalgo (10)], se funda en que la vitamina B₁ acelera la fermentación alcohólica.

La intensidad de la fermentación en determinadas condiciones es proporcional a la cantidad de vitamina y es medida por la cantidad de anhídrido carbónico desprendido en determinado período de tiempo. La medida del gas se efectúa por medio de fermentómetros. Este método no es específico, no resultando satisfactorio.

Por esto estudiamos el método del *Phycomyces blakesleeanus*, de Schopfer (27-28), modificándolo convenientemente.

Gstirner (9), en su tratado, lo describe por su empleo frecuente, in-

cluso en análisis clínicos, señalando como ventaja especial su gran sensibilidad, mayor que la de todos los demás procedimientos conocidos, pudiéndose percibir con él hasta 0,01 μg de vitamina en 25 ml de medio.

Es también de hacer notar su sencillez y pequeño requerimiento.

Además es adoptado después de detallada comparación con el análisis biológico animal, siendo su especificidad de acción sobre la vitamina B₁ mayor que la del ensayo del tiocromo. Schanderl (25) lo emplea para la determinación de esta vitamina, y afirma: es fácil, y su extraordinaria sensibilidad hace que sea un método valioso de determinación biológica.

Debido a esta gran sensibilidad, resulta muy adecuado para la determinación en los vinos, en los cuales se encuentra esta vitamina en dosificables, pero pequeñas, cantidades, pues las levaduras de fermentación toman rápidamente la tiamina del medio (24).

Repetidamente, en los Congresos Internacionales de la Viña y del Vino (7-8), en diversas conclusiones del XII Congreso (4), se insiste en el valor vitamínico de mostos y vinos y necesidad de su investigación, como también en los métodos para su determinación; por ello, después de estudiado este método y modificado convenientemente, lo adoptamos para determinación de la vitamina B₁ en ellos, así como también en las levaduras.

Recientemente, en la última reunión de la Oficina Internacional de la Viña y del Vino (1972), se vuelve a insistir en esta cuestión.

METODO MICROBIOLOGICO DE SCHOPFER, MODIFICADO POR EL AUTOR

La vitamina B₁ es necesaria para el desarrollo del hongo *Phycomyces blakesleeanus*, el cual, por ser incapaz de sintetizarla, sólo se desarrolla y crece en un determinado medio de cultivo cuando éste contiene vitamina B₁, siendo su desarrollo, en determinadas condiciones y dentro de cierto límite, proporcional a la cantidad de vitamina B₁ existente en el medio.

La acción de la vitamina B₁ es cuantitativa, entre ciertos límites; un incremento en la cantidad de ésta causa un correspondiente incremento en el desarrollo del hongo, hasta alcanzar el óptimo, a partir del cual nuevas adiciones no tienen efecto.

La acción de la vitamina depende más o menos de la composición del medio de cultivo, los componentes de éste ejercen cierto influjo sobre la acción de la vitamina; así, con aumento del contenido de nitrógeno (asparagina), la cantidad óptima de vitamina aumenta y la producción de materia seca aumenta también (27). En diversos ensayos, con cantidades diferentes de asparagina, se comprueba lo antes apuntado. También ejercen acción las sales minerales, aumentando la cantidad óptima de vitamina y la producción de materia seca, al aumentar las sales. Nosotros investigamos la acción del sulfato magnésico. Para esto, efectuamos ensayos en las mismas condiciones, con diferente contenido en sulfato, manteniendo igual la cantidad de las demás sustancias. Los resultados (promedio) van expresados en las figuras 1-2.

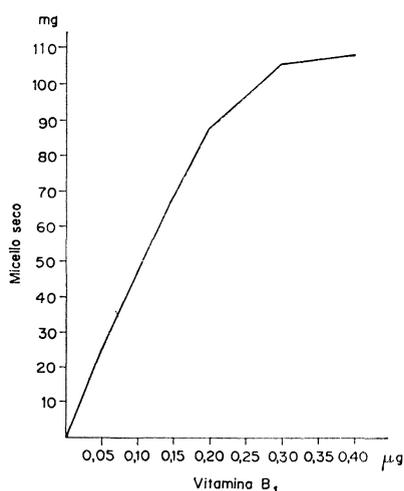


Figura 1. Sulfato magnésico, concentración 0,5 %

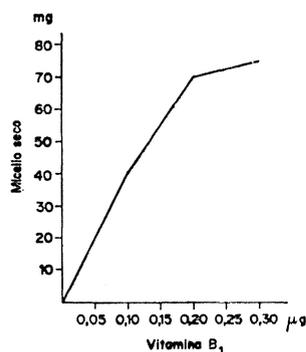


Figura 2. Sulfato magnésico, concentración 0,05 %

Vemos por los ensayos anteriores que con el aumento del contenido en sulfato magnésico la cantidad óptima de vitamina aumenta y la producción de materia seca aumenta también.

Varios ensayos son efectuados para obtener la cantidad óptima de vitamina respecto al desarrollo del hongo *Phycomyces blakesleeanus* (es decir, el límite útil), en las condiciones de cultivo empleadas, cuyos resultados van expresados en las figuras 3-5. La curva patrón obtenida por

adición de cantidad crecientes de vitamina es prácticamente lineal, hasta un contenido determinado de vitamina que depende de la composición del medio.

Por ellos vemos que la cantidad de vitamina en el medio ha de

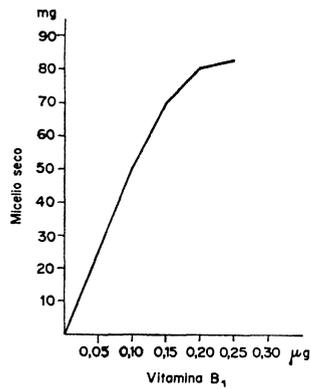


Figura 3

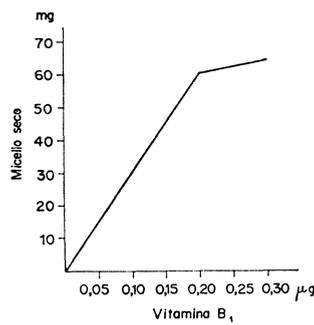


Figura 4

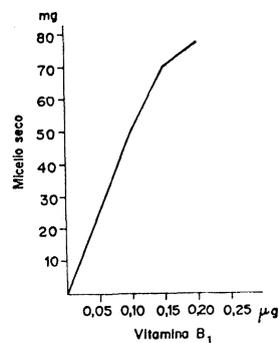


Figura 5

ser pequeña, comprendida dentro de la zona lineal de la gráfica, entre 0,01 - 0,2 µg/25 ml.

Estos resultados ponen también de manifiesto las muchas influencias no controlables que causan variación en el valor del crecimiento del hongo de un experimento a otro; de aquí el no resultar satisfactorio para la determinación cuantitativa de vitamina B₁ obtener una curva patrón

con varias adiciones de ésta y servirse de ella para comparación con las curvas obtenidas con los diversos productos a analizar.

Sería necesario fijar una o varias curvas patrones para cada experimento, con vitamina pura, paralelamente a la serie del producto desconocido, como efectúa Schopfer (27).

Esto tampoco resulta satisfactorio, pues, según apunta este autor, el error más importante de este método es causado por el nitrógeno asimilable acarreado posiblemente por el material a analizar.

Hay que vigilar la uniformidad del contenido en compuestos nitrogenados en la serie a analizar y la serie patrón.

Para ello, en nuestra técnica se opera de la manera siguiente: se preparan dos series de frascos con las siguientes adiciones:

Soluciones añadidas	Testigo ml	Núm. 1 ml	Núm. 2 ml	Núm. 3 ml	Núm. 4 ml	Núm. 5 ml
Medio de cultivo	25	25	25	25	25	25
Solución o suspensión a analizar (vino, mosto, levadura)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1

Soluciones añadidas	Testigo ml	Núm. 1 ml	Núm. 2 ml	Núm. 3 ml	Núm. 4 ml	Núm. 5 ml
Medio de cultivo	25	25	25	25	25	25
Solución o suspensión a analizar (vino, mosto, levadura)	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1
Solución de vitamina B ₁ (0,1 µg/ml)	0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Los testigos solamente con el medio de cultivo para apreciar un insignificante desarrollo del hongo, debido a la germinación de las esporas sembradas, formando un velillo tenue, pero sin dar origen al desarrollo

del micelio. Las esporas del hongo contienen una pequeñísima cantidad de vitamina, factor de crecimiento recibido de la planta madre. Esta reserva sirve tan sólo para producir la germinación, pero no el desarrollo.

La primera serie contiene el medio de cultivo y dosis crecientes del material a analizar (vino, mosto, levadura, en nuestro caso).

La segunda serie, las mismas adiciones de la primera, añadiendo además 0,05 µg de vitamina B₁ a cada uno. Esto, para conocer la acción de la vitamina en presencia de posibles materias introducidas con el material a analizar (nitrógeno asimilable, elementos minerales, etc.).

De la diferencia de desarrollo (expresado en peso) de unos y otros se deduce el correspondiente a la cantidad de vitamina B₁ añadida, influida por el nitrógeno y demás componentes del material a analizar. Correspondiendo ese desarrollo a esta determinada cantidad de vitamina, por el desarrollo correspondiente a la sustancia a analizar podremos deducir la cantidad de vitamina existente en ella.

METODO

Organismo

El hongo *Phycomyces blakesleeanus*, utilizado en este trabajo, se conserva en estrías sobre agar-malta. Se recibió de la American Type Culture Collection.

Medio de cultivo

En el método original de Schopfer (27) se usan 25 ml de medio, compuesto de glucosa, 3 %; asparagina, 1 %; sulfato magnésico, 0,5 %, y fosfato potásico ácido, 1,5 %, con un pH de 4 a 6, esterilizado a 115 °C, durante 20 min, en matraces de Erlenmeyer.

Nosotros empleamos este medio un tanto modificado: glucosa, 3 %; asparagina, 0,1 %; sulfato magnésico, 0,05 %, y fosfato potásico ácido, 0,15 %; pH, 5; repartido en frascos de boca ancha de 125 ml, poniendo 25 ml en cada uno. Esterilizado a 115 °C, durante 20 min.

Todos los productos han de ser purísimos para análisis (en nuestra técnica se emplean de Merck), pues ciertas impurezas pueden influir en el desarrollo del hongo.

Solución origen de vitamina B₁

Clorhidrato de aneurina, seco, se pone en un desecador sobre anhídrido fosfórico y se tiene varios días (al menos, 24 h) para privarle de la humedad que pudiera tener.

Se toman exactamente 100 mg (en balanza de análisis) y se disuelven en etanol al 25 %, diluyendo hasta 1 l (en matraz contrastado) con este mismo etanol. Se guarda en frigorífico. Esta solución es estable si se conserva a 5 °C o por bajo de esta temperatura.

Solución patrón de vitamina B₁

Tomar 1 ml exactamente (con pipeta contrastada) de la solución origen y diluir hasta 1.000 ml (en matraz contrastado), con agua destilada estéril.

Esta solución contiene 0,1 µg de vitamina B₁/ml.
Prepararla nueva antes del uso.

Fosfatasa

Para desdoblar la cocarboxilasa (pirofosfato de aneurina) se han propuesto varias fosfatasas. En nuestra técnica empleamos para determinación en levaduras la fosfatasa existente en la levadura y para otros productos diastasa de Merck, que, según Ritsert (23), contiene suficiente fosfatasa para desdoblar cuantitativamente la cocarboxilasa.

Suspensión de esporas de Phycomyces blakesleeanus para la siembra

Se prepara con un cultivo bien desarrollado (pero no viejo) en agua destilada estéril, asépticamente. Esta suspensión debe contener de 1 a 2 millones de esporas/ml (se cuentan en un cuentaglóbulo); si resulta concentrada se diluye con agua destilada estéril. Todas las operaciones deben realizarse asépticamente.

Preparación de las muestras

La vitamina B₁ no se encuentra en la naturaleza totalmente en estado libre: parte existe en esta forma, parte combinada al estado de cocarboxilasa (pirofosfato de aneurina). De aquí que en las muestras, para su determinación total, haya que liberar primeramente la parte que existe

combinada, pues si bien el crecimiento de *Phycomyces* es determinado por la acción conjunta de la aneurina y de la cocarboxilasa existentes en el producto, ya que esta última posee también acción vitamínica (1 y 31), es, sin embargo, su actividad menor que la de la aneurina.

Por otra parte, para la determinación de la vitamina B₁ en diversos productos, como levaduras, es necesario antes autolizar, y en la autólisis la cocarboxilasa se destruye (1).

Escisión de la cocarboxilasa

Para desdoblar la cocarboxilasa, en el método de Schopfer (27-28) lo efectúan generalmente con el autoclave, pero esto trae consigo una posible causa de error debida a la prolongada acción del autoclave; puede resultar una descomposición por el calor y más o menos completa destrucción de la tiamina, sobre todo si el medio es alcalino o por la acción del autoclave se producen sustancias alcalinas, en cuyo caso la vitamina es rápidamente destruida.

En la técnica por nosotros propuesta se efectúa fermentativamente por medio de una fosfatasa. Existen varias forfatasas, pero a veces son difíciles de conseguir o no se prestan a la determinación. Ritsert (23) ha encontrado que la diastasa de Merck contiene la suficiente fosfatasa para desdoblar cuantitativamente tanto la cocarboxilasa como el éster monofosfórico en vitamina B₁ y ácido fosfórico. Por esto usamos en la técnica esta diastasa de Merck, con un pH 4,5 - 5,0 y manteniendo el producto 4 h en estufa, a 37 °C, para que se produzca la disociación fermentativa.

Para mosto y vino

En erlenmeyer de 50 ml se ponen: de mosto, 6 ml; de vino, 10 ml; se lleva a pH 4,5 - 5,0 y se añaden 0,5 g de diastasa de Merck; tapar con guata y papel y mantener en estufa a 37 °C, durante 4 h.

Para levadura

Nos valemos de la fosfatasa contenida en la misma levadura. Así, se pone la levadura fresca (recién cetrifugada) en matraz cerrado (p. ej., pesasustancias) y se tiene en estufa a 37 °C, durante 4 h.

Autólisis de la levadura

La autólisis de la levadura fresca se obtiene mediante calentamiento a 100 °C, 10 min, con lo cual las células de la levadura se rompen y su contenido se vierte (derrama); el agua de la levadura obra como medio de disolución.

La vitamina B₁ es totalmente estable a 100 °C, durante 10 min, en medio neutro o ligeramente ácido, como es el jugo de levadura.

La temperatura no debe pasar de 100 °C, porque mediante elevadas temperaturas la vitamina se destruye. El tiempo de calentamiento no debe pasar de 10 min, pues por prolongado calentamiento también se perdería vitamina.

Preparación de las series para la investigación

Como se dijo en la técnica analítica, se preparan dos series con la materia a analizar (en nuestro caso, mosto, vino, levadura) preparada según acabamos de decir.

Para análisis en levaduras

Tomar 200 mg de la levadura fresca (lavada y centrifugada) en pesa-sustancias cerrado, y llevar, como ya se dijo, a la estufa, a 37 °C, durante 4 h, para desdoblar la cocarboxilasa; después, calentar a 100 °C, durante 10 min, para autolizar la levadura.

La levadura así preparada se pone en suspensión homogénea con agua destilada estéril y se lleva a 50 ml.

Antes de tomar la muestra, agitar para uniformar la suspensión.

De esta manera las adiciones en las series 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 - 1 ml de esta suspensión homogénea corresponden a 0,8 - 1,6 - 2,4 - 3,2 - 4 mg de levadura fresca.

El lavado, para privarla del medio de cultivo interpuesto, el cual puede aportar cierta cantidad de vitamina, así, vino, cerveza, etc., se realiza inmediatamente del centrifugado y rápidamente, por dos veces, con agua destilada estéril y fría (a 0 °C). De esta manera no se pierde vitamina en la levadura que no ha sufrido la autólisis.

Esterilización

Todos los frascos de una y otra serie son esterilizados a 100 °C, durante 10 min.

Siembra

Después de enfriamiento se añaden asépticamente a cada uno de los frascos 0,2 ml de la suspensión de esporas de *Phycomyces blakesleeanus*.

Incubación

Una vez inoculados, se dejan los frascos en reposo, en la oscuridad y a la temperatura ambiente (siempre que esta no sea ni muy baja ni muy alta, más bien baja, pues la temperatura de incubación óptima es de 15 °C y la cantidad de micelio formada disminuye rápidamente, según se aleja de esta temperatura).

Generalmente se efectúa a 20°-22 °C. A temperaturas elevadas no se desarrolla, así, por encima de 25 °C ya se desarrolla poco y mal y a 30°-33 °C (en las épocas calurosas) no se desarrolla y hay que acondicionarlos a 20°-22 °C para que se efectúe el desarrollo.

El tiempo de incubación es de 10-11 días, cuando los esporangióforos han alcanzado el máximo desarrollo.

Medida del crecimiento de los cultivos

Una vez desarrollados éstos, se separa del medio de cultivo de cada frasco el micelio (o cultivo) que se ha desarrollado; se lavan con agua destilada para privarles del medio de cultivo adherido. Los micelios limpios se ponen en pesasustancias tarados y se secan en estufa a 100 °C. Una vez desecados se pesan (hasta peso constante) en balanza de precisión (para apreciar hasta 0,1 mg).

Cálculos

(Como ya se dijo al describir la técnica.)

La diferencia de desarrollo (expresado en peso) de una y otra serie da el correspondiente a la cantidad de vitamina B₁ añadida, influida por el nitrógeno y demás componentes del material a analizar. Correspondiendo ese desarrollo a esta determinada cantidad de vitamina, por el desarrollo correspondiente a la sustancia a analizar podremos deducir la cantidad de vitamina existente en ella.

Después del cálculo correspondiente a cada frasco (núms. 1, 2, 3, 4 y 5) se calcula el promedio de aquellos que están comprendidos dentro del límite útil 0,01-0,2 µg de vitamina B₁.

Se debe operar con contenidos comprendidos entre 0,01 y 0,2 μg de vitamina B_1 /125 ml, límites entre los cuales la curva patrón es prácticamente lineal.

DISCUSION

De las investigaciones realizadas se deduce, que el método biológico-microbiano del *Phycomyces blakesleeanus* para determinación de vitamina B_1 , con la técnica establecida, da resultados precisos, siendo su sensibilidad extraordinaria y, por tanto, especialmente adecuado para la determinación en sus tancias cuyo contenido en esta vitamina sea relativamente bajo, habiendo sido ampliamente experimentado y extensamente empleado en trabajos de investigación sobre vitamina B_1 en mostos, vinos y levaduras.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Una vez estudiados los diversos métodos propuestos para determinación de la vitamina B_1 , optamos por el del *Phycomyces blakesleeanus*, descrito por Schopfer (27) modificándolo convenientemente y adaptándolo para la determinación en mostos, vinos y levaduras.

Las modificaciones introducidas, se refieren:

- 1) Al medio sintético de cultivo; como la acción de la vitamina depende más o menos de la composición del medio, al variar esta, se efectúan una serie de ensayos para obtener la cantidad óptima de vitamina respecto al desarrollo del *Phycomyces* en las condiciones de cultivo empleadas.
- 2) Como el error más importante de este método, según se dijo, es causado por el nitrógeno asimilable acarreado posiblemente por el material a analizar, para evitar este inconveniente se establece la técnica anteriormente descrita.
- 3) Otra causa de error puede ser debida a la prolongada acción del autoclave empleada para la escisión de la cocarboxilasa (sobre todo si se produce en medio alcalino); puede resultar una descomposición por el calor y destrucción parcial de la tiamina. Por ello, en nuestra técnica, efectuamos el desdoblamiento de la cocarboxilasa fermentativamente por medio de una fosfatasa.

- 4) Se efectúa una adaptación del método para determinación en mostos, vinos y levaduras, estudiando la manera de efectuar la determinación en estas sustancias, escisión de la cocarboxilasa, autólisis de la levadura.
- 5) Se estudian las condiciones de cultivo, temperatura de incubación, adoptando las más convenientes.

SUMMARY

Modification of the Phycomyces blakesleeanus method for investigation of vitamin B₁

The *Phycomyces blakesleeanus* method described by W. H. Schopfer for investigation of vitamin B₁ is studied and modified conveniently, adapting it for determination in musts, wines and yeasts.

From the investigations performed it has been found that this biologic microbial method, with the established modification and technique, gives excellent results, its sensitivity being extraordinary and, therefore, particularly adapted for the determination in substances which have a comparatively low content of this vitamin.

BIBLIOGRAFIA

1. AUHAGEN, E. 1933. Biochem. Z., 258, 330.
2. BARGER, G. 1935. Ber. Deut. Chem. Ges., 68, 2257.
3. BONNER and ERICKSON, 138. Amer. J. Bot., 25, 23.
4. 1968. XII^o Congrès International de la Vigne et du Vin, Bucarest.
5. CONNOOR, B. 1948. Methods of Vitamin Determination. Burgess Publis. Co., Minneapolis.
6. DELLWEG, H., und BERNHAUER, K. 1956. Biochem. Z., 328, 264.
7. FLANZY, M., et CAUSERET, J. 1954. Bull. OIV, 282, 19.
8. GARINO-CANINA, H. E. 1956. Bull. OIV, 211.
9. GSTIRNER, F. 1944. Métodos Fisicoquímicos para la Determinación de Vitaminas, 100-1. Manuel Marín, Editor, Barcelona.
10. HIDALGO, A. 1951. Microbiol. Españ., 4, 139.
11. HOTZEL, A. 1949. Vitamin und Vitamin Präparate, 184-87. GMBA. Aulendorf, Editio Cantor, Württ.
12. JANSEN, B. 1936. Rec. Trav. Chim., 55, 1046.
13. JANSEN, B. 1938. Z. Vitaminforsch., 7, 239.
14. KARRER, W., und KUBLI, U. 1937. Helv. Chim. Acta, 20, 369.
15. KNIGHT, B. C. 1945. Vitam. Horm. New York, 3, 117.

16. KUHN. 1935. *Z. Physiol. Chem.*, 234, 196.
17. LOHMANN, K., und SCHUSTER, Ph. 1937. *Biochem. Z.*, 188, 294.
18. MYRBACK, K., und VALLIN, J. 1945. *Sv. Kem. Tidskr.*, 56, 400.
19. OTTO, H., und RUHMEKORB, F. 1938. *Klin. Wochenschr.*, 17, 1246.
20. PEYNAUD, E., et LAFOURCADE, S. 1957. *Ind. Agr. Aliment.*, 74, 897.
21. RIBEREAU-GAYON, J., et PEYNAUD, E. 1964. *Traite d'Oenologie*, I, 112. Edit. Dunod, Paris.
22. RIBEREAU-GAYON, J., et PEYNAUD, E. 1966. *Traite d'Oenologie*, II, 122. Edit. Dunod, Paris.
23. RITSER, K. 1939. *Klin. Wochenschr.*, 18, 1370.
24. ROSE, A. H., and HARRISON, J. S. 1971. *The Yeasts*, 2, 23. Academic Press, London and New York.
25. SCHANDERL, H. 1950. *Die Mikrobiologie des Weines*, 1, 47. Eugen Ulmer éd., Stuttgart.
26. SCHNEYDER, J. 1965. *Bull. OIV*, 293.
27. SCHOPFER, W. H. 1943. *Plants and Vitamins*, 257-67. Waltham, Mass., U. S. A. Published by the Chronica Botanica Company.
28. SCHOPFER, W. H., and YUNG, A. 1936. *V^e Congr. Int. Tech. Chim. Ind. Agr. C. R.*, 22.
29. SCHULZ, A.; ATKIN, L., and FREY, C. N. 1937. *J. Amer. Chem. Soc.*, 59, 958.
30. SCHULZ, A.; ATKIN, L., and FREY, C. N. 1942. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 14, 35.
31. The Association of Vitamin Chemists. 1947. 1951. 1966. *Methods of Vitamin Assay*, 69, 75, 85. Interscience Publishers. Inc., New York.

*CENTRO NACIONAL DE VIROLOGIA Y ECOLOGIA SANITARIAS
SERVICIO DE BIOLOGIA SANITARIA
MAJADAHONDA (MADRID)*

A COMPARATIVE STUDY OF PRECIPITING SEROLOGICAL TECHNIQUES FOR THE DETECTION OF MENINGOCOCCAL POLYSACCHARIDE

by

J. CASAL, PILAR PÉREZ-BREÑA and CECILIA MARTÍN-BOURGON

INTRODUCTION

Edwards (2) and Greenwood et al. (4) have applied the Immunoelectrophoresis (IEP) technique to detect the capsular polysaccharide antigen of meningococcus in the diagnosis of meningococcal meningitis infection. Greenwood points out that as a means of diagnosis he obtained better results with IEP than with direct staining and bacteriological isolation from cerebrospinal fluid (CSF). In addition to giving better results the diagnosis with IEP is quicker.

Taking into account these considerations, we decided to apply the IEP to detecting the antigen, comparing its sensibility with two other techniques: double gel diffusion and radial gel diffusion.

In performing the tests we used as antigens a suspension of meningococci disrupted by freezing and thawing and a purified polysaccharide. We determined by all the three methods the minimal concentration of organisms detected and the amount of polysaccharide which corresponds to these concentrations.

MATERIALS AND METHODS

Meningococci strains

We used strain C11 supplied by Dr. Artenstein (Department of Bacteriology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C.) and strain B-0657 supplied by Dr. Vanderkerkove (Laboratoire de Recherche de Microbiologie, Marseille). Strain C11 was used to produce both antigens and antiserum, and strain B to produce only antiserum to be used as a control.

Media

Two media were used: a) Mueller Hinton agar medium (Difco) to maintain the organisms, and b) casamino acid technical (Difco) to isolate the polysaccharide.

Antisera

We used our own B and C antisera. Rabbits were inoculated intravenously with a suspension of meningococci in saline ($3,000 \times 10^6$ microorganism/ml) inactivated by heating them in a water bath at 60 °C for 60 min. Six inoculations of increasing dosages, 0.2 ml, 0.2 ml, 0.3 ml, 0.3 ml, 0.4 ml and 0.5 ml were done every two or three days, and five days after the sixth injection the serum agglutinin ability determined, and if agglutinins were detected the animals were bled. As a reference we used antisera from Difco Laboratories (lots 555,429 and 566,471).

Antigens

a) Disrupted meningococci. Plates with Mueller Hinton agar were inoculated with meningococcus C, placed in a humidified container and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. After 18 h the organisms were harvested, concentrated in saline to 2×10^9 meningococci/ml and frozen and thawed six times in dry ice.

b) Purified polysaccharide. The method described by Gotschlich et al. (3) was used as follows. A culture of 4,000 ml of casaminoacid technical medium was inoculated with meningococcus C and incubated in order to obtain a final concentration of 2×10^9 microorganisms/ml. This suspension was treated with cationic detergent Cetavlon (Imperial Chemi-

cal Industries) as a precipitating agent of the polysaccharide. After eliminating the detergent, proteins and nucleic acids, we obtained 5 mg as a final product.

The amount of protein in this product determined by the Lowry method (5) was 0,66 % and the amount of DNA determined by the Burton method (1) was 0,23 %.

Double gel diffusion test

The gel consisted of 1 % agarose (Behringwerke) in saline pH 7.2. Amounts of 2.5 ml of the gel were poured onto ordinary slides. Six peripheral wells were cut around a central reservoir. Each well was 3 mm in diameter and the edge was 4 mm from the edge of an adjacent reservoir. 10 μ l of reagent was added to each well placing the antisera in the central cup and the dilutions of the antigens in the peripheral ones.

The slides were used the same day they had been prepared. After adding the reagents they were incubated at room temperature in a humidified atmosphere during 18 h.

Radial diffusion test

We used the same gel as in the previous method but in this case the slides were 90 \times 30 mm in size, and 3.6 ml of the gel was poured on each. Before pouring the gel, the antiserum was added, mixing them at 50 °C in a water bath. We tried antiserum concentrations from 1 % to 15 % and the best results were obtained with the 4 % one. Therefore, we used this concentration to perform the tests.

Two rows of seven wells were cut, each well was 3 mm in diameter and separated 10 mm from the adjacent wells.

Polysaccharide dilutions were dispensed into the upper row and meningococci dilutions into the lower one. The slides were incubated at room temperature in a humidified atmosphere. After 18 h the results were read.

Immunoelectrophoresis (IEP)

Slides 90 \times 30 mm in size were covered with 3.6 ml of 1 % agarose in diethylbarbiturate-acetate buffer solution, pH 8.2. Two parallel rows of wells 3 mm in diameter were cut 7 mm apart.

Two slides were prepared. The wells of one row contained antiserum

on both slides. The other row contained meningococci dilutions on one slide and polysaccharide dilutions on the other. Both slides were placed in the apparatus (Shandor SAE 3235) with the wells containing antiserum near the anode side of the chamber. Electrophoresis was carried out at room temperature for 45 min using a constant current of 15 mA/slide.

Two fold dilutions of polysaccharide and disrupted meningococcus in saline solution pH 7.2 were used in the three tests. We considered a pure concentration 30 $\mu\text{g/ml}$ for the polysaccharide and 2×10^9 microorganisms/ml for the disrupted meningococci.

RESULTS

Our first purpose was to determine the number of precipitating lines produced by the disrupted meningococci and to compare them with the line produced by the polysaccharide.

Figure 1 shows the single line precipitated by the meningococci by double gel diffusion and its identity with the line of the polysaccharide. From this moment on, we considered the precipitating lines of both series of dilutions as the same antigenic fraction, and we calculated the amount of polysaccharide present in the meningococci dilutions by comparing the lines produced by them with those of the polysaccharide dilutions, whose concentration we already know.

Figure 2 shows the results obtained by the double gel diffusion. The central reservoir contained antisera type C in the left and central rosette and antisera type B as a control in the rosette on the right hand. Dilutions of the polysaccharide were dispensed in the peripheral wells of the left and right rosettes and dilutions of the disrupted meningococci in the central rosette. We obtained lines up to the 1/8 (3.75 $\mu\text{g/ml}$) dilution for the polysaccharide and up to the 1/2 ($1,000 \times 10^6$ meningococci/ml) dilution for the disrupted meningococci. There was no line in the control rosette.

Figure 3 shows the radial gel diffusion results: In the upper row the polysaccharide dilutions form a ring from pure up to 1/32 (0.937 $\mu\text{g/ml}$) and in the lower row the disrupted meningococci dilutions from pure up to 1/8 (250×10^6 meningococci/ml).

Figures 4-5 show the precipitating lines obtained by IEP for the poly-

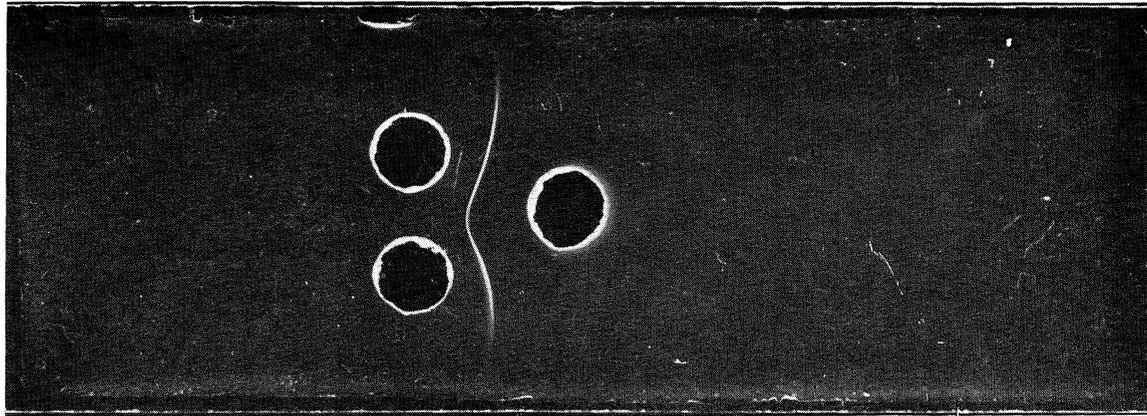


Figure 1. Antigen identity by double gel diffusion test. Upper wells contain antigens: disrupted meningococci group C on the left and its polysaccharide on the right. Lower well contains group C antisera

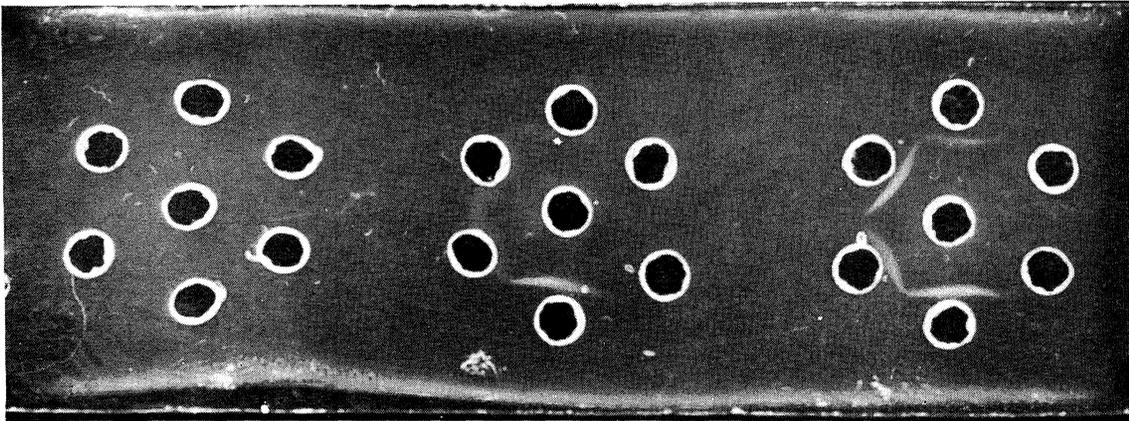


Figure 2. Double gel diffusion test. Antisera group C is contained on the left side and central rosette and group B in rosette on the right (control). Polysaccharide dilutions are contained in the peripheral wells of the rosettes in the edges and disrupted meningococci group C dilutions in those of the central one

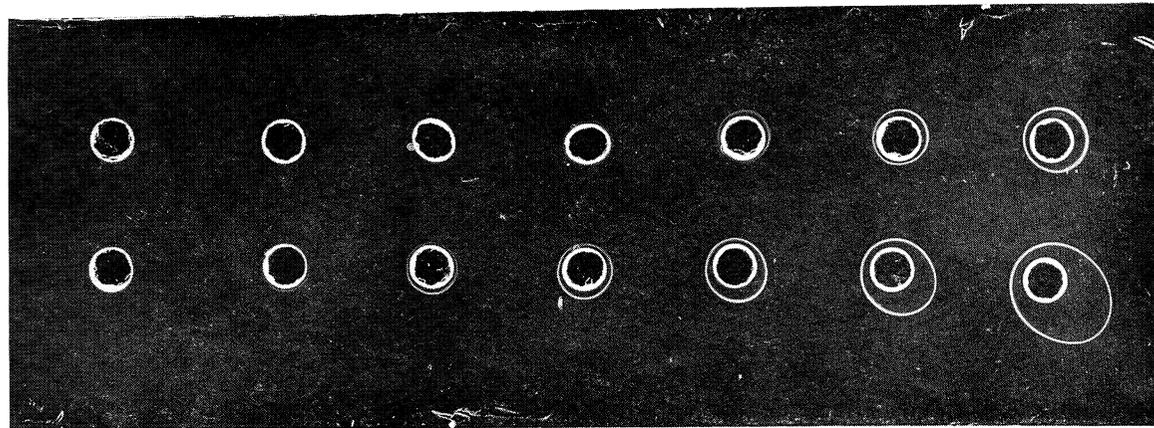
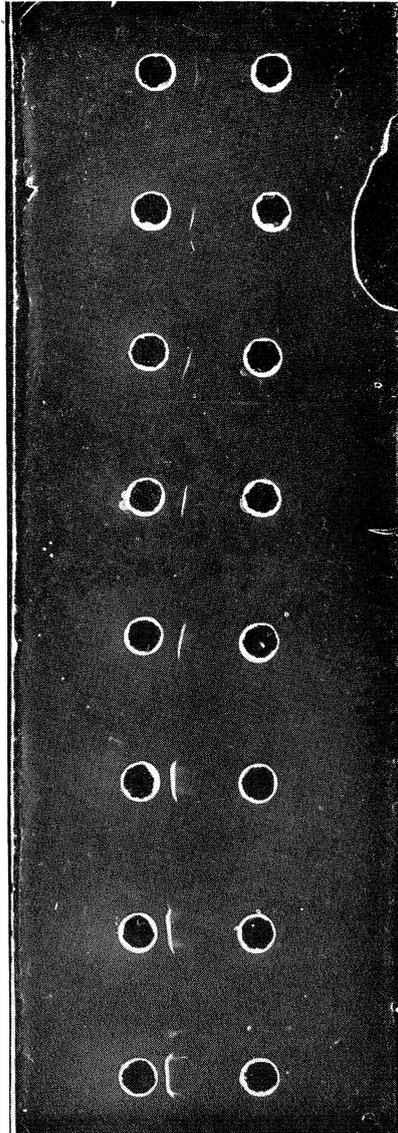


Figure 3. Radial gel diffusion test. Polysaccharide and disrupted meningococci group C dilutions are contained in the upper and lower row respectively. 4 % antisera was added to the gel

*Figure 4*

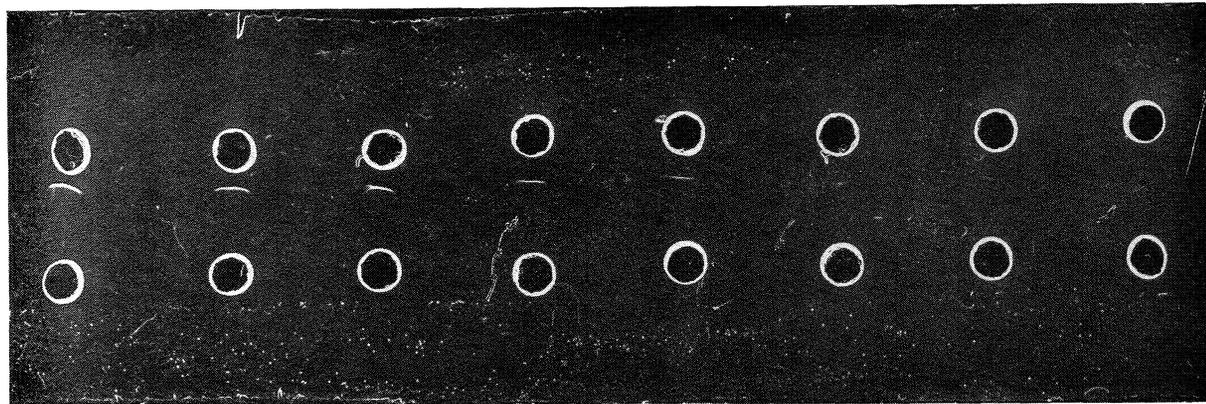


Figure 5

Figures 4-5. Immunoelectrophoresis. Upper row (anode side) contain antisera and lower row polysaccharide dilutions for number 4 and disrupted meningococci dilutions for number 5

saccharide and disrupted meningococci dilutions respectively. In the former a line is seen with the naked eye up to the 1/128 dilution. But with the aid of a hand lens we could see it up to the 1/512 (0.058 $\mu\text{g/ml}$). In the later we saw a line up to the 1/128 (15.6×10^6 meningococci/ml) dilution.

All these results are summarized in *table I* in which time of incubation and sensitivity of the three methods for both meningococcal suspension and polysaccharide are compared.

Table 1. Time of incubation and sensitivity obtained by the three methods

Method	Time of incubation	Sensitivity	
		Number of meningococcus detected / ml	Amount of polysaccharide detected / ml
Double gel difusión	18 h	$1,000 \times 10^6$	3.75 μg
Radial difusión	18 h	250×10^6	0.937 μg
Immuno-electrophoresis.	45 min	15.6×10^6	0.058 μg

DISCUSSION

From the results we conclude that among the three methods studied, the IEP is the most sensitive and the quickest in performance, but an apparatus to make it is needed. According to our results the last precipitating concentrations correspond to 0.058 μg for the polysaccharide and to 15.6×10^6 microorganisms for the disrupted meningococci. Therefore we assume that both figures correspond to each other.

Gel diffusion is the less sensitive method. Large concentrations of polysaccharide are needed to obtain precipitating lines, and it is not probable that the cerebrospinal fluid contains such concentrations. Therefore, it does not seem to be useful as a diagnostic procedure.

Although radial diffusion is less sensitive than IEP it has the advantage of being easily performed and the slides can last prepared for a long time. It remains to see if the concentration of polysaccharide in the cerebrospinal fluid is enough to be determined by this technique.

SUMMARY

Three different techniques for detecting the polysaccharide antigen of meningococcus were compared and their sensitivity measured. Double gel diffusion was the less sensitive. Radial gel diffusion although less sensitive than IEP is considered a possible diagnostic procedure. IEP, finally, seems to be the more suitable.

The amount of polysaccharide corresponding to a certain number of meningococci was calculated.

RESUMEN

Estudio comparativo de técnicas serológicas de precipitación para la detección de polisacárido de meningococos

Se compara la sensibilidad de tres técnicas de precipitación por difusión en agar, para la determinación del antígeno polisacárido de meningococo C. La difusión doble resultó ser la menos sensible. La difusión radial, aunque menos sensible que la inmunoelectroforesis, se considera como una técnica con posibilidades de ser útil aplicada al diagnóstico. La inmunoelectroforesis, por último, parece ser la más adecuada para este fin.

Se calculó la cantidad de polisacárido correspondiente a las diferentes concentraciones de meningococos.

REFERENCES

1. BURTON, K. 1956. A study of the conditions and mechanisms of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.*, 62, 315-23.
2. EDWARDS, E. A. 1971. Immunologic investigations of meningococcal disease. 1. Group-specific *Neisseria meningitidis* antigens present in the serum of patients with fulminant meningococemia. *J. Immunol.*, 106, 314-17.

3. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y., and ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B and C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129, 1349-65.
4. GREENWOOD, B. M.; WHITTLE, H. C., and DOMINIC-RAJKOVIC, O. 1971. Counter-current immunoelectrophoresis in the diagnosis of meningococcal infections. *Lancet.*, 519-12.
5. LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L., and RANDALL, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent *J. Biol. Chem.*, 193, 265-75.

CENTRO NACIONAL DE VIROLOGIA Y ECOLOGIA SANITARIAS
SERVICIO DE BIOLOGIA SANITARIA
MAJADAHONDA (MADRID)

METABOLIC INHIBITION TEST
FOR THE MEASUREMENT OF ANTIBODY TO
NEISSERIA MENINGITIDIS

by

J. CASAL and CECILIA MARTIN-BOURGON

INTRODUCTION

Among the variety of methods used for the detection of antibody developed in men after meningococcal infection or vaccination - i. e.: agglutination, precipitation, quellung, protection of mice, complement fixation, opsonization, bactericidal reaction, indirect hemagglutination and immunofluorescence - the most valuable in the measurement of the immune status of individuals or populations is the test for bactericidal activity (1). Goldschneider et al. (2-3) have clearly related the bactericidal antibody with immunity to meningococcal infection.

Since the tests described for the measurement of bactericidal properties of antibodies are difficult in performance, or need special equipment (5), we have developed a variation of the bactericidal test in which the inhibition of growth of meningococci is evidenced by failure in a metabolic change. This test of easier performance has been successfully applied to the measurement of antibody to mycoplasmas (6) and is based in the ability of the organisms to ferment carbohydrates with the production of acid. When phenol red is added into the medium, this reac-

tion is accompanied by a color change. The addition of specific anti-serum to the medium inhibits meningococci growth and this inhibition can be visualized by failure of the phenol red to change color.

The present communication describes the application of the metabolic inhibition test for the quantitative measurement of antibodies to the different groups of meningococci.

MATERIAL AND METHODS

Meningococcus strains

Strains A-1a and C-1 1 were supplied by Dr. Arntenstein (Department of Bacteriology, Walter Reed Army Institute of Research, Washington, D. C.) and strain B-HR was isolated from the cerebrospinal fluid of a patient with meningitis, from the Hospital del Rey (Madrid).

Media

The medium used for the isolation and multiplication of the meningococci was Mueller Hinton agar (Difco). To prepare stocks of meningococci and to perform the tests a medium was prepared with the following constituents: Mueller Hinton broth (Difco) 50 ml, 10 % glucose solution (Merck) 2.5 ml and 0.2 % phenol red solution (Merck) 2.5 ml. The pH of this medium as 7.1. Stock solutions were prepared on advance, sterilized and dispensed conveniently and stored at 4 °C till they were needed. Complete medium was always prepared just before use.

Casamino acid technical (Difco) with the addition of glucose and phenol red and pH adjusted to 7.2 was also tried but it gave a poorer growth and therefore was not used.

Complement

The source of complement was guinea pig serum (GPS) obtained by bleeding a large number of guinea pigs. The addition of 20 % GPS into the medium produced a rise in the pH from 7.1 to 7.4. In order to determine the presence of natural specific antibodies in the GPS, titrations of the meningococci in medium containing 10 % and 20 % GPS were carried out. When an inhibitory effect was found, complement was absorbed with the involved strain as described by Kasper and Wyle (5).

Antisera

Comercially obtained typing antisera (Difco and Pasteur Laboratories) were used for routine serogrouping, and rabbit antisera prepared in this laboratory to A-1a, C-11 and B-HR strains were used for the metabolic inhibition tests. A preinoculation rabbit serum was obtained in all instances and its ability to agglutinate any group of meningococci tested. Rabbits were inoculated intravenously with a suspension of meningococcus in saline ($3,000 \times 16^6$ microorganisms ml) inactivated by heating them in a water bath at 60 °C for 60 min. Inoculations of increasing dosages (from 0.2 ml up to 0.5 ml) were done every two or three days, and five days after the sixth injection the serum agglutinin ability determined, and if agglutinins were detected the animals were bled.

Preparation and titration of stocks of meningococcus

Plates with Mueller Hinton agar were inoculated, placed in a humidified container and incubated at 37 °C in an atmosphere of 5 % CO₂. After 18 h the organisms were taken from the agar with a sterile wire, suspended in 50 ml of complete medium in a 250 ml flask, and incubated at 37 °C on a rotary platform shaker revolving at about 120 r/min as described by Gotschlich, et al. (4). The culture was observed each hour until a color change from red to yellow. This required about 3 h. The broth culture was then divided into 0.5 ml amounts and stored to -70 °C. One of such amounts was titrated weekly by making serial tenfold dilutions. 0.05 ml amounts of each dilution were dispensed into the cups of a microtitre plate and 0.15 ml of medium added into each cup. The microtiter plates were sealed and incubated at 37 °C on the shaker platform revolving at 60 r/min. The titre was considered to be the highest dilution which produced a color change in more than 50 % of the cups when the test was read at a time when color changes were no longer progressive.

Since the medium employed was highly rich in constituents and no antibiotics were used to prevent contamination, controls of sterility were performed on each step of the test. Contamination by other microorganisms was easily detected since they produced quicker and deeper color change and turbidity than the meningococcus.

Metabolic inhibition test (MI test)

Tests were performed as described by Taylor-Robinson et al. (6) for mycoplasma.

Disposable microtiter plates with U-shaped cups (Cooke Engineering Company, Alexandria, Virginia) were used. To avoid contamination maximal sterility conditions were required. Plates were placed under ultraviolet light for 5 min before use. Medium and sera were dispensed and diluted with 0.025 ml droppers and diluters manufactured by Cooke Engineering Company. One drop of medium (0.025 ml) was added into each cup and serial twofold dilutions of sera were made with the diluters. The antisera was previously inactivated in a water bath at 56 °C for 30 min.

Appropriate meningococci dilutions were then added in 0.05 ml amounts into each cup, and the total volume made up to 0.2 ml by the addition of 0.125 ml (5 drops) of medium. Complement was included in the final 0.125 ml of medium. Cups with only medium and with medium plus meningococci were put as control. Plates were sealed with cello tape and incubated at 37 °C on a rotary platform shaker revolving at about 60 r/min.

Color changes were observed by placing the plates over a mirror. The highest serum dilution which prevented a color change in more than 50 % of the cups when compared with the same dilution of organisms grown in the absence of antiserum was considered as the serum titre end point.

RESULTS

Relationships between color change and growth of meningococcus

Meningococci were diluted in tenfold steps in 2 ml vials containing 1.8 ml complete medium. 0.2 ml of each dilution were transferred to the cups of a microtiter plate so that eight dilutions were contained in the eight rows of the plate. Cups with medium only were put as control. Two of such plates were prepared and both incubated at 37 °C under aerobic conditions, revolving one plate at 60 r/min. Color changes were recorded as soon as they appeared and incubation was prolonged until changes

were no longer progressive. To confirm the absence of contaminants, samples of different cups with and without color change were studied by Gram staining and by inoculation into agar plates. There was always a correlation between color changes and growth of meningococcus. Titres obtained in the shaken plate were of 1 or 2 logs higher than those observed in the other. Moreover, growth was quicker in the shaken plate, so, all plates were shaken thereafter.

Titration of the same stocks were performed by inoculating tenfold dilutions into Mueller Hinton agar plates. Colonies were counted after incubation over-night at 37 °C in an atmosphere containing 5 % CO₂. Titres obtained by this procedure did not significantly vary with titres obtained by change of color.

Titration of immune rabbit serum

Block titrations of all strains with their homologous antisera were performed by diluting the organisms in serial tenfold steps and the sera in twofold steps. *Table 1* shows the metabolic inhibition serum titres of the different dilutions obtained after 16 h incubation.

Table 1. Titres of rabbit antisera, prepared to meningococci B-Hr, A and C, with different concentrations of homologous strain, obtained by MI test

Meningo- coccus strain	Titres (*) of rabbit antiserum with homologous organisms recorded after 16 h incubation				
	No. of organisms/ml used				
	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²
B - HR	32	64	512	4,096	8,192
A	<32	32	512	2,048	4,096
C	64	128	1,024	4,096	8,192

(*) Titres expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a color change.

Titration of the three strains with their respective pre-inoculation sera and with heterologous antisera were also performed. Comparative results with homologous antisera are shown in *table 2* (see *figure 1*).

Table 2. Titre of rabbit pre-immunization sera and antisera to meningococci B-HR, A and C, with homologous and heterologous strain as measured by MI test

Meningo- coccus strain	Titres (*) obtained using a dilution with 10 ³ organisms/ml			
	Pre-serum (**)	Rabbit antiserum to:		
		B - HR	A	C
B - HR	8	4,096	8	8
A	2	4	2,048	2
C	2	16	2	4,096

(*) Titres expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a color change. (**) Serum of rabbit obtained previous to inoculation with respective strain if meningococci.

Effect of the concentration of organisms used in the test

In the experiment shown in *table 1* the titre of the antiserum varies according to the dilution used. Taylor-Robinson et al. (6) describe that for the mycoplasmas the serum titre is relatively unaffected by the size of the inoculum if serum titres are recorded when the pH of the control titration of the inoculum has just changed half a pH unit. We could not apply this rule for meningococci because of its rate of growth: according to our results, color changes of half a pH unit should be recorded between 10 and 16 h of incubation. As we obtained good patterns with 16 h incubation, for practical reasons we choose this time as a routine in our tests. In the following experiments (*tables 2-3*) a dilution containing 10³ organisms ml was used, and plates were read after 16 h incubation.

Effect of the complement

To determine the optimal concentration of complement to use in the tests, different amounts of GPS were added to the medium, in order to obtain final concentrations of 0, 1 %, 5 %, 10 %, 15 % and 20 %. Metabolic inhibition tests were carried out with meningococci and their homologous antisera diluted 1/16 in the presence of such concentrations

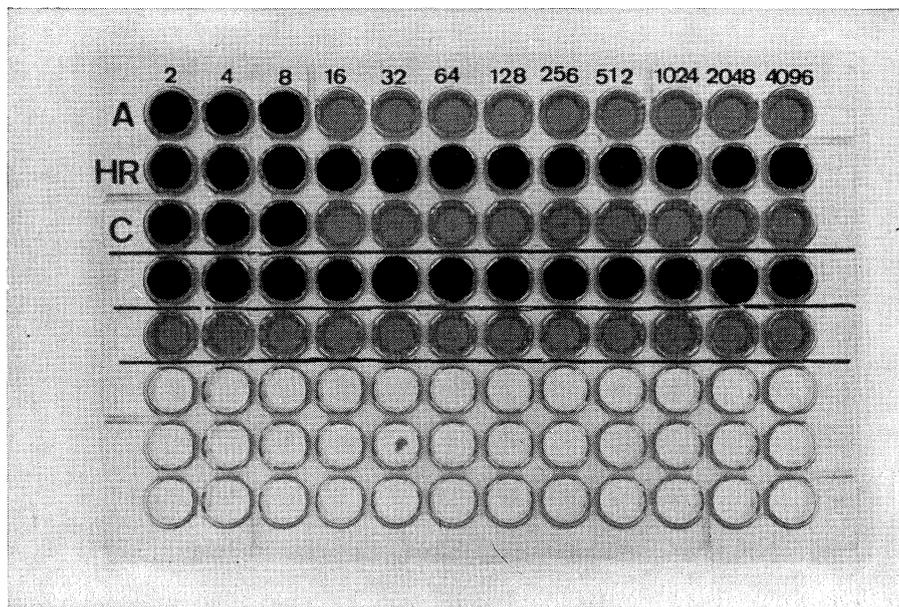


Figure 1. Metabolic inhibition test of meningococcus HR versus homologous and heterologous rabbit antisera. Numbers in the upper side of the plate show the dilutions of the sera. First, second and third row contain dilutions of antisera A, HR and C. Forth row contains medium control and fifth row meningococcus control

of complement. As shown in *table 3* the antibody titre decreased as the complement concentration diminished. Best results were obtained with 20 % GPS whereas low antibody titres were obtained with 5 % and no inhibition occurred with 1 % or when no GPS was present. We performed all the tests with 20 % GPS but we consider differences among 10 %, 15 % and 20 % small enough to be discarded when large amounts of complement are needed.

Table 3. Effect of the amount of complement (Guinea pig serum) in the titre of rabbit antisera in MI test with homologous meningococci

Meningococcus strain	Titres (*) obtained using a dilution with 10 ³ organisms/ml with:					
	NO GPS	1 % GPS	5 % GPS	10 % GPS	15 % GPS	20 % GPS
B - HR	<32	<32	512	2,048	4,096	8,192
A	<32	<32	512	2,048	4,096	4,096
C	<32	<32	1,024	4,096	8,192	8,192

(*) Titres are expressed as the reciprocal of the highest dilution giving a color change.

Inhibitory effect

Titration of meningococci in the presence of 10 % and 20 % GPS resulted in a slight enhancement of growth for B-HR and C strains and a total inhibition of growth for strain A. So, in tests with meningococcus A, complement was absorbed with this strain previous to use.

DISCUSSION

Since the bactericidal assay and metabolic inhibition test are basically the same reactions and only the way in which the results are read differ, we assume that both test measure the same bactericidal —protective— antibodies. Bactericidal antibodies express a good index of the immune status of individuals or populations, therefore MI test should be a good tool for epidemiological studies.

In addition MI test should be useful in assessing the immunological status of individuals before natural infection or vaccination and therefore it could be of help in the diagnosis of meningitis by studying paired sera to detecting antibody rises.

Some factors involved in the test were evaluated. Different amounts of complement were tried, obtaining best results when 10 to 20% (final concentration) was used. We employed 20% for the description of the method, but for serological surveys 10% gives good results. In some instances, complement showed natural non specific antibodies to a certain meningococcus, and in such cases complement was absorbed with the homologous strain previous to use.

Titres of sera are closely related to the concentration of organisms used in the test. As a standard we choose a dilution containing 10^3 organisms/ml. Dilutions of larger concentrations i. e. 10^5 or 10^6 , were tried with the purpose of accelerating the reaction, but in such cases no inhibition was observed even with homologous antisera. This was due, probably, to the excess of organisms.

All test were performed in good sterility conditions to avoid growth of contaminants but in some cases contamination did occur.

The method appears specific and sensitive as shown in the cross tests. High homologous titres were obtained for the three strains representative of each of the three groups but the antisera did not inhibit the growth of heterologous strains except for strain B-HR in which low levels of cross reactivity were observed. A titre of 1/8 was also determined in the rabbit preinoculation sera. These results could prove the presence of certain natural antibodies in rabbit sera.

In tests with strains A and C and their homologous rabbit antisera it was observed that high dilutions of antiserum inhibited color change, whereas the lowest dilutions (from 1/2 to 1/32) did not inhibited the color change. We considerad this effect as a "zone effect" and in tests with homologous antisera dilutions 1/2 to 1/16 were omitted to avoid confussing results.

The advantages of using the metabolic inhibition test are various: 1) The performance is easier than the bactericidal standard reaction since one important step (inoculation of plates) has been eliminated. 2) A larger number of sera can be tested at the same time. 3) No special equipment is needed as happens with the radioactive bactericidal test.

SUMMARY

The metabolic inhibition test used for the measurement of antibody to certain mycoplasma species which ferment glucose with the production of acid was applied to meningococci. Glucose and phenol red were added to the medium so that growth of meningococci was evidenced by a color change. Specific antiserum inhibited growth of meningococci and therefore acid production —color change— did not occur. Factors concerning the feasibility of the method for meningococci were evaluated. The test was proved to be sensitive and specific. The addition of 10 to 20% guinea pig serum as the source of complement was essential to demonstrate the inhibitory effect of the antiserum.

RESUMEN

Prueba de inhibición metabólica para medir anticuerpos frente a Neisseria meningitidis

La capacidad de los meningococos de fermentar la glucosa produciendo acidez sirvió de base para aplicar la prueba de inhibición metabólica de los micoplasmas (6), a la determinación en sueros de anticuerpos frente a los meningococos. Para ello se cultivaron estos gérmenes en caldo de Mueller Hinton con glucosa y rojo de fenol. El crecimiento se puso de manifiesto por un cambio de color de rojo a amarillo, en el medio. En presencia del antisuero correspondiente y de complemento, el crecimiento se inhibe y no tiene lugar el cambio de color.

Las pruebas se realizaron en placas del microtitulador con pocillos en forma de U. Se titularon sueros antimeningocócicos frente a las cepas homólogas y heterólogas, obteniéndose títulos de 8.192 y 4.096 con las especies homólogas, y bajos niveles de reacción cruzada con las heterólogas.

La presencia de complemento (concentración final entre 10 y 20%) es necesaria para que la reacción tenga lugar, lo cual nos lleva a considerar que los anticuerpos medidos son de tipo bactericida.

Los anticuerpos bactericidas expresan el estado inmunitario del individuo (1); por ello, la prueba de inhibición metabólica puede ser

un buen arma para realizar estudios epidemiológicos y para determinar elevación de anticuerpos después de la infección o vacunación.

REFERENCES

1. ARTENSTEIN, M. S.; BRANDT, B. L.; TRAMONT, E. C.; BRANCHE, W. C.; FLEET, H. D., and COHEN, R. L. 1971. Serologic studies of meningococcal infection and polysaccharide vaccination. *J. Infect. Dis.*, 124, 277-88.
2. GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E. C., and ARTENSTEIN, M. D. 1969. Human immunity to the meningococcus. I. The role of humoral antibodies. *J. Exp. Med.*, 129, 1307-26.
3. GOLDSCHNEIDER, I.; GOTSCHLICH, E. C., and ARTENSTEIN, M. D. 1969. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J. Exp. Med.*, 129, 1327-48.
4. GOTSCHLICH, E. C.; LIU, T. Y., and ARTENSTEIN, M. S. 1969. Human immunity to the meningococcus. III. Preparation and immunochemical properties of the group A, group B, and group C meningococcal polysaccharides. *J. Exp. Med.*, 129, 1349-63.
5. KASPER, D. L., and WYLE, F. R. 1972. Bactericidal antibody assay using ¹⁴C-labeled *Neisseria meningitidis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 139, 1175-80.
6. TAYLOR-ROBINSON, D.; PURCELL, R. H.; WONG, D. C., and CHANOCK, R. M. 1966. A colour test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. *J. Hyg.*, 64, 91-104.

REUNION SOBRE MICROBIOLOGIA HOSPITALARIA RESUMENES DE COMUNICACIONES

Convocada por la Sección Regional del Noroeste de la Sociedad Española de Microbiología, ha tenido lugar esta Reunión en Santiago de Compostela, durante los días 1-3 del pasado mes de junio. La organización ha corrido a cargo del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago, que dirige el Prof. Benito Regueiro.

A continuación se recogen los Resúmenes de las Comunicaciones leídas, por orden de presentación.

Efecto de la restricción del consumo de cloxacilina en la población de Staphylococcus aureus cloxacilín-resistente, por L. de Rafael, A. de Carvajal y E. Gómez Mampaso. (Ciudad Sanitaria "La Paz", Madrid.)

En el período de marzo a junio de 1972 se observó un progresivo aumento de las cepas de *Staphylococcus* resistentes a la cloxacilina en el Hospital (0 % de resistencias en los meses de enero y febrero, 10,2 % en marzo, 33,3 % en abril y 37,2 % en mayo). A partir del 15 de junio de 1972 se adopta la medida de prohibir el uso intrahospitalario de las cloxacilinas, recuperándose la sensibilidad de forma progresiva (en junio, 32,1 % de resistencias; 16,3 % en julio, 25 % en agosto, 10,5 % en septiembre y 0 % en octubre).

La reutilización ulterior de este grupo de antibióticos, a partir de noviembre de 1972, llevó consigo la aparición de estirpes resistentes, aunque el porcentaje total de resistencias no ha subido del 15 %.

El estudio por fagotipia demostró que las cepas cloxacilín-resistentes pertenecían al grupo fágico III (77,7,43a).

Relación entre la producción de colicinas y enteropatogenia del E. coli, por M. D. Peñalver y A. Vico. (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.)

Basamos nuestro trabajo en la relación que existe entre los distintos serotipos de *E. coli* y la producción de colicinas. Para ello seleccionamos 70 razas aisladas de casos de gastroenteritis infantiles, de las cuales 31 pertenecen al serotipo 0119:B14, coleccionadas en el transcurso de 1971-72, y 29 del serotipo 0111:B4, recogidas en el presente año. Han aparecido casos aislados de los serotipos 055:B5, 018:B12, 0125:15.

Procedemos a la prueba de actividad colicinogénica, comparando con las 16 razas productoras de Fredericq y, siguiendo su técnica de la doble capa, resultan productoras el 65 % del serotipo 0111:B4 y no productoras el 35 %. Respecto a los otros serotipos, no se encontró hasta el momento ninguna raza productora frente a 20 indicadoras probadas.

Se observó que las razas indicadoras del serotipo 0119:B14 eran poco sensibles, mientras que las del serotipo 0111:B4 y las no enteropatógenas son muy sensibles a las colicinas.

Las colicinas encontradas son del tipo B, E, I, M y C.

Estudio comparativo de la técnica de coprocultivo y método de inmunofluorescencia en el diagnóstico de las diarreas infantiles por E. coli enteropatógeno, por M. A. Morera, F. Fernández Pérez, M. L. de Buen, J. Caldes y E. Pérez Trallero. (Servicio de Bacteriología y Serología, Ciudad Sanitaria "Francisco Franco", Barcelona.)

Se estudian 597 heces, procedentes de la Clínica Infantil, mediante coprocultivo y con la técnica directa de inmunofluorescencia.

Los resultados positivos mediante inmunofluorescencia son superiores a los obtenidos mediante coprocultivo.

Se hace un estudio crítico en cuanto a la razón de concordancia entre ambas pruebas.

Como conclusión general puede afirmarse que la detección rápida de *E. coli* enteropatógeno mediante inmunofluorescencia tiene validez como prueba de "orientación diagnóstica", pero existe un 29,9 % de casos en que existe discordancia.

Infecciones urinarias, infecciones respiratorias e infecciones de heridas, procedentes de enfermos ingresados, por P. Sánchez Calvo y D. R. Alvarez (Residencia Sanitaria "Virgen de la Arrixaca", Murcia).

Nuestro trabajo lo orientamos recogiendo estadísticas divididas en tres grupos: infecciones urinarias, infecciones respiratorias e infecciones de heridas, todas ellas procedentes de enfermos ingresados.

Ponemos de manifiesto la sensibilidad antibiótica en cada grupo para una determinada serie de gérmenes. Recogemos gráficamente sus respuestas y hacemos estudios comparativos para la elección de los antibióticos.

Gérmenes aislados en el hospital, por V. Sanchis-Bayarri Vaillant y A. Ferrer García. (Facultad de Medicina, Valencia.)

Utilizando diversos medios de cultivo, en especial el medio de Rose-now, se aislaron en varios hospitales los gérmenes que se indican a continuación, los cuales fueron identificados según las técnicas descritas por Blair, Cowan, Bailey y Buttiaux. Los gérmenes son los siguientes:

Coli, Alkalescens, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Providencia, Salmonella, Shigella, Brucella, Vibrio, Pseudomonas, Aeromonas, Xantomonas, Achromobacter, Chromobacterium, Alcaligenes, Mima, Herella, Moraxella, Flavobacterium, Bordetella, Hemophilus, Yersinia, Listeria, Corynebacterium, Bacillus, Mycobacterium, Nocardia, Neisseria, Gemella, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococo, Neumococo, Micrococcus, Eggertella, Clostridium y Candida.

Durante el transcurso de este estudio, que corresponde a los dos últimos años, se aprecia un progresivo aumento de cromobacteriosis (Brisou) e infecciones por *Klebsiella*.

Estudio cualitativo y cuantitativo de gérmenes anaerobios en infecciones urinarias, por J. A. García Rodríguez, J. Prieto Prieto, E. García Sánchez y F. Martín Luengo. (Cátedra de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Salamanca.)

Se estudian 50 orinas sembrando en agar-sangre y VL-sangre para recuento de aerobios, y en VL-sangre en anaerobios para detectar los posibles anaerobios estrictos. Se resiembran en medios profundos que nos muestran el tipo respiratorio, y efectúa después la identificación morfológica y bioquímica.

Hemos observado la presencia aproximadamente en un 40 % de las muestras de gérmenes anaerobios, en algún caso como germen único al que se consideró responsable de la infección urinaria.

La experiencia demuestra que es posible la negatividad de recuentos en aerobiosis, con sintomatología clara de infección de vías urinarias.

Listeria monocytogenes en enfermos tumorales, por E. Gómez Mampaso, L. Michaux y M. Martínez Ferrer. (Ciudad Sanitaria "La Paz", Madrid.)

El hallazgo de *Listeria monocytogenes* en diversos cuadros clínicos de la patología humana se ha hecho cada vez más frecuente en estos últimos años. Su incidencia en madres gestantes, prematuros, neoplásicos, esplenectomizados, enfermos sometidos a terapia inmunosupresora y, en general, en todos aquellos aquellos enfermos con un déficit en sus mecanismos de defensa apoya el concepto de que *L. monocytogenes* es una bacteria fundamentalmente oportunista.

Hemos tenido la ocasión de encontrar *Listeria monocytogenes* en dos individuos afectados de procesos tumorales (carcinoma epidermoide bronquial y enfermedad de Hodgkin) sometidos a terapia inmunosupresora.

El microorganismo se aisló respectivamente por cultivo de esputo y de un hemocultivo. Para su identificación se realizaron distintas pruebas que esencialmente fueron: reconocimiento de la colonia, gram, catalasa, movilidad en medio blando, aglutinación, inmunofluorescencia directa, capacidad fermentativa. Los tipos de *Listeria monocytogenes* encontrados correspondieron respectivamente a los tipos antigénicos I y IV. La serología en medio sólido (según técnica de M. Despierres) fue positiva en el paciente del carcinoma y negativa en el paciente afecto de Hodgkin. El diagnóstico diferencial microbiológico tuvimos que realizarlo principalmente con cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* beta hemolítico y con organismos de la familia de las Corinebacteriáceas.

Bacteriología de las otitis medias crónicas supuradas en nuestro medio actual, por N. García Soto. (Clínica Otorrinolaringológica de la Facultad de Medicina, Santiago de Compostela.)

Se expone la dificultad de una correcta toma de la muestra, así como la necesidad de ésta. Se presentan una serie de recogedores construidos por el autor y técnica de su uso.

Se estudian por este sistema, del orden de 50 casos de otitis medias crónicas supuradas, particularmente resistentes a los tratamientos habituales. Seleccionados entre 2.300 pacientes otorrinolaringológicos.

Se exponen los resultados hallados y se comparan con los obtenidos por Friedmann en 1957. Se comentan las diferencias. Los principales cambios afectan a la cantidad y comportamiento de los estafilococos y al porcentaje de los estreptococos. Los gram-negativos son estadísticamente parecidos en ambos estudios.

Se citan los antibióticos más activos y se plantean dos interrogantes ¿Qué hacer ante una infección por un germen sensible a un solo antibiótico? ¿El mismo antibiótico usado local y parenteralmente?

Presencia de bacteroides del grupo fragilis en productos patológicos, por J. A. García Rodríguez, J. Prieto Prieto, M. C. Sáenz González y E. García Sánchez. (Cátedra de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Salamanca.)

Se estudian 118 productos patológicos de procedencia diversa, aislándose por cultivo en anaerobiosis 73 cepas de bacteroides de distintas especies. El aislamiento se basa en la acción estimulante que las sales biliares tiene sobre el crecimiento de estos gérmenes.

La identificación de las cepas se hizo bioquímicamente y el estudio de la sensibilidad a los antibióticos se efectuó por el método disco-placa.

El alto porcentaje de cepas aisladas habla de la frecuencia en el Hospital y del posible mantenimiento de infecciones supuradas.

Llama la atención la gran sensibilidad de estos gérmenes a la rifampicina y furantoína, y su resitencia constante a los aminósidos.

Bacteriocinogenia de especies de Streptococcus, grupo D, por M. E. Fernández y P. Odriozola. (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.)

Hemos coleccionado 116 razas de enterococo aisladas de muestras biológicas: 22 % de heces, 52,8 % de infecciones de tracto urinario y 25,2 % de otras procedencias (otitis, secreciones bronquiales, gástricas, etcétera).

El estudio bacteriocinogénico de estas razas dio como resultado que

el 40 % de ellas son productoras de enterococinas (bacteriocinas de este grupo de *Streptococcus*) y 84 % han sido sensibles, en mayor o menor grado, a dichas enterococinas, sin haber encontrado entre ellas ninguna sensible a su propia enterococina.

Estas bacteriocinas las hemos clasificado según su espectro de actividad y su sensibilidad o resistencia a cloroformo, calor (80 °C) y enzimas proteolíticas (tripsina); observando la relación que existe entre tipo de enterococina y especies de *Streptococcus* del grupo D identificadas mediante sus propiedades reductoras, proteolíticas, hemolíticas y de fermentación de azúcares, como: *St. faecalis propium*, *St. faecalis* var. *liquefaciens*, *St. faecalis* var. *zymogenes*, *St. faecium* y *St. durans*.

Estudio estadístico de 13.000 hemocultivos, por J. Arnal, J. Calico, M. C. Domínguez, T. González Fuentes y J. A. Roca Viñals. (Servicio de Bacteriología y Serología, Ciudad Sanitaria "Francisco Franco", Barcelona.)

Se hace una revisión de 13.000 hemocultivos, efectuados en los distintos Centros de esta Ciudad Sanitaria durante el período de 1967 a 1973.

La finalidad de este trabajo es señalar los gérmenes prevalentes en nuestro medio en las infecciones sépticas.

Se valoran los resultados obtenidos teniendo en cuenta la procedencia, edad del enfermo y agente etiológico.

Se hace un estudio epidemiológico más detenido del grupo de infecciones producidas por gérmenes poco frecuentes, subrayando su importancia creciente en la Medicina Hospitalaria.

Características bioquímicas y susceptibilidad a los antibióticos de 30 cepas del grupo Enterobacter-Serratia aisladas en nuestro Hospital, por J. B. Marco Lamata, J. L. Arribas Llorente, E. Lomba Fuente y M. L. Aisa Iriarte. (Sección de Bacteriología, Ciudad Sanitaria "José Antonio Primo de Rivera", Zaragoza.)

A partir de diversos productos patológicos procedentes de distintos procesos clínicos, se aíslan 30 cepas, que tras selección de pruebas bioquímicas, confirman la pertenencia al grupo *Enterobacter-Serratia*. Se valora la sensibilidad antibiótica por métodos de difusión en medio (disco-placa) y concentración mínima inhibitoria. Se estudian las gráficas respectivas de sensibilidad y se valoran los resultados, estableciendo con-

clusiones varias, referidas a las infecciones hospitalarias por el grupo *Enterobacter-Serratia*.

Estudio comparativo in vitro de diferentes cefalosporinas frente a 50 cepas de enterobacterias aisladas, por R. Martín Alvarez y J. Méndez García. (Ciudad Sanitaria "Nuestra Señora de Covadonga", Oviedo.)

Se determina la concentración mínima inhibitoria de 50 cepas de diferentes enterobacterias (*E. coli*, *Klebsiella*, *Proteus* y *Citrobacter*), aisladas en orina, frente a cefalotina, cefalexina, cefaloridina y cefapirina, mediante el método de dilución en medio sólido.

Se estudia y compara el posible sinergismo de las cefalosporinas y gentamicina en las cepas de *Proteus mirabilis* aisladas, también por el método de dilución en medio sólido.

Se concluye analizando las diferentes respuestas *in vitro* de las distintas cefalosporinas.

Estudios en piocinotipia y sensibilidad a antibióticos de razas de Pseudomonas, por M. C. Pintos e I. Otero. (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.)

Hemos realizado un estudio epidemiológico con 56 cepas de *Pseudomonas* aisladas de muestras biológicas, en el Servicio de Bacteriología del Hospital General de Galicia.

Mediante diversas reacciones bioquímicas (indol, urea, TSI, citocromo-oxidasa, etc.), capacidad para crecer a diferentes temperaturas y a concentraciones del 6 % de ClNa, así como la producción de diferentes pigmentos, se procedió a su identificación como *Pseudomonas aeruginosa* y *Ps. fluorescens*.

Se determinaron los piocianotipos en diferentes medios, siendo el tipo P16 el que aparece con mayor frecuencia: 67,8 %. El 32,2 % restante pertenece a otros cinco tipos distintos.

Se hizo un estudio de sensibilidad frente a antibióticos, por el método de dilución en tubo y posterior siembra en placa de agar, determinando así la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de los antibióticos que resultaron activos por la técnica de difusión en placa: carbenicilina, colistina, fosfomicina y gentamicina.

Amoxicilina: una nueva penicilina semisintética de amplio espectro, por J. Subirón, C. Anglada, J. Barja y H. Bovio. (Departamento Médico, División "Beecham" de Laboratorios "F. Bonet", Madrid.)

La amoxicilina (BRL 2333), es la alfa-amino-p-hidroxibencil-penicilina, una nueva penicilina semisintética de amplio espectro, similar en actividad a la ampicilina. Tras de administración por vía oral a voluntarios sanos, la amoxicilina alcanzó concentraciones séricas aproximadamente dobles de las obtenidas con dosis equivalentes de ampicilina. La absorción de la amoxicilina no se vio interferida por la presencia de alimentos en el estómago, al contrario de lo que ocurre con la ampicilina. La amoxicilina se excretó por la orina en concentraciones muy superiores a la ampicilina; recuperándose de la orina el 60 % de la dosis administrada en las primeras 6 h después de su ingestión, alcanzándose el 78 % cuando la experiencia se prolongó durante 8 h. Se examinan diferentes derivados del 6-APA, distinguiéndose entre aquellas penicilinas semisintéticas que actúan tras de su hidrólisis generando ampicilina y las que, como la amoxicilina, son nuevos antibióticos de la familia de las beta-lactaminas.

Se remarca la actividad *in vivo* de amoxicilina comparativamente a la de la ampicilina a igualdad de dosis, independientemente de los niveles hemáticos alcanzados por el primero de los dos antibióticos.

Se concluye que la amoxicilina es un nuevo antibiótico del grupo de las penicilinas semisintéticas de acción bactericida, de amplio espectro, que suponen una indudable ventaja por su superior absorción, difusión, eliminación y actividad *in vivo*.

Estudio sobre la síntesis y secreción de invertasa por células de Saccharomyces 303-67, por S. Gascón, F. Moreno, A. G. Ochoa y P. S. Lazo. (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Salamanca.)

El estudio de la síntesis y secreción de invertasa por levaduras se ha llevado a cabo utilizando el antibiótico cicloheximida, inhibidor de la síntesis proteica, así como la 2-desoxi-d-glucosa, que actúa a nivel de la adición de carbohidrato. En *Saccharomyces 303-67* se conoce la existencia de dos formas moleculares de invertasa, una de peso molecular 135.000 (invertasa ligera), que carece de carbohidrato, y otra de peso

molecular 270.000 (invertasa pesada), que contiene un 50% de carbohidrato, cuya localización principal es externa a la membrana plasmática.

La síntesis de invertasa está reprimida por glucosa; utilizando la concentración óptima de 10 mM de glucosa, se observa que la cicloheximida y la 2-desoxiglucosa afectan a la síntesis de invertasa a dos niveles diferentes; en el primer caso se acumula invertasa pesada a expensas de una disminución de los niveles de invertasa ligera; en el segundo caso se acumula invertasa ligera en el interior del protoplasto y aparece una serie de formas intermedias en peso molecular.

De esta forma ha sido posible separar los procesos biosintéticos del fenómeno de secreción.

Antibiograma de los antifúngicos 5-fluorocitosina, nistatina y anfotericina B) de 82 cepas de Candida aisladas en la Clínica Puerta de Hierro, Madrid, por A. Sánchez Sousa y M. Moreno López.

Estudio de 82 cepas de *Candida albicans* aisladas de diferentes fuentes (esputo, tráquea, orina, exudado, perionixis, vagina, boca, hemocultivo, cateter, etc.) identificada según método del Instituto Pasteur: a) formación de clamidosporas en medio PCB, b) técnica de Tachjian o filamentación en suero humano, c) auxonograma: utilización de azúcares, d) prueba de fermentación de azúcares en medio semisólido (agar 6%) en tubo.

Estudio de la CMI de las 82 cepas a los tres antifúngicos 5-fluorocitosina, anfotericina-B y nistatina por el método de botán-placa-medio sólido, utilizando diferentes concentraciones de dichos antifúngicos que van de 100 µg/ml a 0,04 µg/ml.

Resultados y conclusiones

Se observa que las dosis necesarias de antifúngico para la inhibición del crecimiento de las 82 cepas de *Candida albicans* son más bajas con la 5-fluorocitosina que con los otros dos polienos estudiados e igualmente las CMI de las cepas para la anfotericina-B son más bajas que en el caso de la nistatina.

Nuestros resultados son comparados con los realizados por otros autores como Smith Shadomy, Hamilton Muller y Drouhet, encontrando el mismo porcentaje de resistencias de entrada para la 5-fluorocitosina que el último autor citado.

Antibiograma de distintas especies microbianas, siguiendo las recomendaciones de la OMS, por A. Rodríguez, T. Olay y J. M. Mata. (Instituto de Farmacología Española, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.)

Un estudio de sensibilidad en 360 cepas hospitalarias de distintas especies microbianas frente a 17 antibióticos y 4 quimioterápicos, siguiendo las recomendaciones de la OMS.

Resultados

Se reseñan sólo los antimicrobianos más activos: *E. coli* (178 cepas) sensibles a genta. 98 %, fosfo. 91 %, colist y ác. nalid. 82 %, cefao. 74 %, nitrof. 72 %. *P. mirabilis* (31 cepas), sensibles a genta. 100 %, fosfo. 97 %, kana. 87 %, ác. nalid. 85 % y cefalot. 71 %. *P. indoligenos* (30 cepas), sensibles a ác. nalid. 96 %, genta. 87 % y nitrof. 65 %. *Ps. aeruginosa* (74 cepas), sensibles a colist. 96 %, fosfo. 89 %, genta. 84 %, carbe. 64 %. *Kleb/Ent.* (71 cepas), sensibles a genta. 98 %, colist. 94 %, ác. nalid. 92 %, kana. 65 %, cefalot. 64 %. *Serratia* (67 cepas), sensibles a fosfo. 100 %, genta. 98 %, ác. nalid. 95 %, kana. 74 %, carbe. 71 %. *Salmonella typhi* (33 cepas), sensibles el 100 % a fosfo., cloranf. y ampic. *Streptococcus* (32 cepas), sensibles a cloranfenicol 100 %, eritro. 97 %, fosfo. ampi. 72 %. *Staph. aureus* (68 cepas), sensibles a fosfo., genta., linco., novob., rifamp., kana., cefalot. y ác. fusid. 90-98 %, closac. 84 %. *D. neumoniae* (12 cepas), sensibles a eritro., ampi., cefalot., 100 %, fosfo. 92 %, cloranf. 75 %. *N. gonorrhoeae* (27 cepas), sensibles a tetra., cloranf. y eritro. 100 %, peni. 94 %, fosfo., cefalot. y kana. 98 %.

Conclusión

Fosfomicina, nuevo antibiótico de amplio espectro, muy activo frente a gram-positivas y gram-negativas estudiadas, con excepción de *Kleb/Ent.*

El Laboratorio de Virología en el hospital. Problemas y posibilidades, por M. Martínez Ferrer, M.^a A. Maseguer y L. Michaux. (Ciudad Sanitaria "La Paz", Madrid.)

El establecimiento del cultivo de tejidos en centros hospitalarios parece necesario como etapa primaria que permite un mayor número de aisla-

mientos que los realizados por envío directo de muestras no inoculadas a Centros Nacionales. Luego de analizar algunos detalles de montaje, se resume la experiencia de ocho meses de funcionamiento de esta sección sobre 85 muestras patológicas infantiles inoculadas sobre líneas de origen comercial WI-38 (31 orinas), Hep-2 (27 exudados faríngeos, 1 muestra salival) y Vero (10 muestras fecales, 8 LCR, 5 líquidos vesiculares, 2 pericárdicos y 1 exudado conjuntival). El número total de aislamientos positivos ha sido de 4, lo que representa el 4,7 % de las muestras, habiéndose obtenido 2 CMV, 1 polivirus y 1 herpesvirus.

Se señalan las dificultades en la provisión de líneas comerciales en buenas condiciones. En 9 lotes controlados pudimos detectar la presencia de *Mycoplasma orale* tipo I en 4 de entre ellos (44,4 %). El resto presentó buena viabilidad (media superior a los 30 días).

Se analiza por último el porcentaje de contaminaciones en relación con el entrenamiento del personal auxiliar en la preparación del material de vidrio.

Estudios en diagnóstico de hepatitis sérica por antígeno "Australia" y otras pruebas, por I. Bernárdez, M. T. Garea e I. Iglesias. (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad de Santiago de Compostela.)

Hemos estudiado la evaluación de la efectividad de las pruebas hepáticas usuales en el diagnóstico de hepatitis víricas: tasa de transaminasas séricas, glutámico-oxalacética SGOT y glutámico-pirúvica SGPT; bilirrubina total y determinación del antígeno "Australia" HAA por inmuno difusión (M. Outcherlony, v. Prince).

Trabajamos con 70 sueros de enfermos del Centro de Diagnóstico y Tratamiento de la Seguridad Social "Concepción Arenal", con diagnóstico clínico de hepatitis vírica y algunos con disfunciones y otras enfermedades del hígado.

De nuestro trabajo se deduce lo siguiente: el HAA es positivo en un 50 % de los casos de hepatitis séricas, en ellos la tasa de transaminasa glutámico-pirúvica SGTP está elevada en más de 50 U (23 %) y de 100 U (10 %). En hepatitis séricas HAA negativo, las tasas de SGTP se elevan menos en general, pero existen casos con valores elevados.

Sujetos no diagnosticados de hepatitis vírica presentan HAA (8 %), nivel SGTP y bilirrubina normal.

En hepatitis crónicas, las transaminasas se elevan hasta valores normales, niveles de SGTP de más de 100 U (50 %) y HAA negativo. En hepatitis crónicas persistentes, SGTP normal y muy alta bilirrubina.

Amoxicilina en el tratamiento de infecciones crónicas de los bronquios, por H. Bovio, J. Subiron, J. Barja y C. Anglada. (Departamento Médico, División "Beecham" de Laboratorios "F. Bonet", Madrid.)

La amoxicilina por vía oral ofrece muchas ventajas en el tratamiento de las infecciones crónicas no tuberculosas de las bronquitis, así como para tratar las exacerbaciones infecciosas agudas de las bronquitis crónicas. El antibiótico es bien tolerado, es muy activo y puede ser administrado por vía oral a dosis moderadas y altas. Como informaron May y Bürgui, alcanzan concentraciones en el esputo que cubren las CIM de los organismos más frecuentemente responsables. Estas concentraciones en esputo son mayores y persisten más tiempo que con la ampicilina y se obtienen aún en pacientes con expectoración mucosa, lo que parece mostrar una habilidad para su difusión tisular superior a la comprobada para la ampicilina. Se comprueba una actividad favorable en pacientes con exacerbaciones agudas, cuya evolución favorable se prolonga durante más tiempo que con otros antibióticos utilizados.

Infecciones humanas por Brucella, detectadas por el proceder de inmunofluorescencia, por J. A. García Rodríguez, F. Esteban García y M. C. Sáenz González. (Cátedra de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Salamanca.)

Se estudian 100 sueros de presuntos enfermos de brucelosis y donde fueron detectadas inmunoglobulinas específicas de infección.

Se introduce para su diagnóstico la prueba de inmunofluorescencia indirecta y se estudia el título de la reacción, comparativamente con la clásica reacción de aglutinación, presentando resultados y conclusiones al respecto.

Localización celular y modo de acción de la beta-(1-3)-glucanasa en levadura Picchia polymorpha, por T. G. Villa, M. Gato y J. R. Villanueva. (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Salamanca.)

Las beta-(1-3)-glucan-glucanohidrolasas (E.C., 3.2.1.6) son enzimas

de amplia distribución en microorganismos. En levaduras, estas hidrolasas endógenas se suponen funcionalmente relacionadas con la disolución del componente estructural de la pared celular en los procesos de morfogénesis y autólisis.

La actividad en *Picchia polymorpha* aparece en sobrenadantes de cultivo y es además detectable en extractos celulares, alcanzando valores máximos durante las últimas fases de crecimiento activo.

La actividad es en ambos casos debida a enzimas similares que exhiben un bajo peso molecular por filtración en gel (25.000), termoestables hasta los 40 °C, que muestran idéntica Km sobre la minarina y con acción máxima a pH 5,0.

Experimentos realizados sobre la localización de la enzima asociada a células, utilizando la beta-glucosidasa como enzima marcadora intracelular, indican que la beta-(1-3)-glucanasa se sitúa preferentemente entre la membrana y la pared celular. El análisis de su modo de acción sobre el sustrato revela que la hidrólisis enzimática sigue un modelo exohidrolítico, comenzando a partir del extremo terminal no reductor.

Infecciones por Mycobacterium tuberculosis en enfermos hospitalizados comunes, por J. A. García Rodríguez, F. Martín Luengo, M. C. Sáenz González y J. Prieto. (Cátedra de Microbiología e Higiene, Facultad de Medicina, Salamanca.)

Se estudia una serie de productos patológicos (esputos, orinas, LCR y líquidos pleurales) procedentes de enfermos ingresados en el Hospital Clínico, y de los que se solicitó un estudio bacteriológico de rutina.

La técnica de homogeneización seguida es la preconizada por Tisson, con lauril-sulfato sódico.

En todos los casos se estudió la presencia de micobacterias por los métodos de Ziehl-Neelsen y fluorescencia con naranja de acridina.

El producto depurado se siembra en medios de Lowenstein-Jensen y Coletsos; todas las cepas fueron identificadas bioquímicamente.

Los resultados obtenidos justifican la introducción de este tipo de técnicas en el ambiente hospitalario.

Preparación de habitación ultra-limpia y lactante receptor, para trasplante de médula ósea, por F. Baquero y M.^a C. Martínez Pérez. (Ciudad Sanitaria "La Paz", Madrid.)

Se describen las técnicas de preparación de una zona ultra-limpia para el postoperatorio de un lactante de 7 meses afecto de timoalinfoplasia, al que se realizó trasplante de médula ósea. La zona constó de box de enfermo, con incubadora; box de enfermera y box de material estéril, y se dispuso una zona SAS para el contacto exterior. La esterilización de la zona (sin movimiento de aire) se realizó a partir del día (—10) con una mezcla de aldehído glutárico, amonio cuaternario y sal organometálica (Panasept) ambiental de superficies, que llegó a reducir un 96,20 % la contaminación ambiental previa. Una vez el niño ingresado, se montuvo el control con fenoles-cresoles (Phagoghene), y se usó clorohexidina para las maniobras antisépticas sobre superficie llevadas a cabo por la enfermera.

El lactante fue tratado preoperatoriamente en vistas a conseguir su total descontaminación. En los días (—5) y (—4) se utilizó paromomicina por vía oral y cefalotina + fosfomicina por vía parenteral. Del día (—3) en adelante se trató con vancomicina + nistatina por vía oral y se inició terapia parenteral con gentamicina. A partir del día (—1) se administró gentamicina por vía oral (20 mg/8 h). Se mantuvo el esquema hasta el día (+8), en que el niño falleció por causas no bacterianas.

La necropsia demostró la absoluta esterilidad aerobia y anaerobia de bacterias en todos los territorios orgánicos del niño.

Diagnóstico y tratamiento prodrómico en un caso de sepsis por Neisseria meningitidis tipo B, por M. López Brea y M. Baquero. (Laboratorio de Bacteriología, Hospital Nacional de Enfermedades Infecciosas, Madrid.)

Se presenta un caso de observación personal de una niña de 7 años de edad con antecedentes familiares de un hermano afecto tres días antes de sepsis meningocócica con púrpura generalizada. Este hecho, unido a la valoración clínica de síntomas prodrómicos con escasa repercusión general (febrícula, molestias abdominales difusas y dolor en una pierna) que también se habían manifestado en el hermano enfermo, llevó a la pre-

sunción diagnóstica de sepsis meningocócica incipiente. Hipótesis que quedó confirmada por el hallazgo de *Neisseria meningitidis* tipo B en el hemocultivo, así como en el exudado rinofaríngeo de la niña.

El diagnóstico bacteriológico precoz y el tratamiento específico en fase prodrómica permitió detener la aparición de manifestaciones clínicas de todo tipo en un probable cuadro agudo de sepsis meningocócica.

Relación entre los serotipos de Pseudomonas aeruginosa y otros marcadores epidemiológicos, por L. Gaztelurrutia, F. Fernández Pérez y J. A. Muñoz Villanueva. (Servicio de Bacteriología y Serología, Ciudad Sanitaria "Francisco Franco", Barcelona.)

Se estudia la eventual relación de los serotipos de *Pseudomonas aeruginosa* con la resistencia a los antibióticos y piocianotipos.

Se han utilizado en este trabajo 250 cepas aisladas de diferentes productos patológicos. La clasificación antigénica en grupos O se efectuó según trabajos de Habs y Veron; los antibióticos se determinaron según técnica de Chabbert, y la piocianotipia, según Gillies y Govan.

Se discuten los resultados obtenidos y se señalan unas conclusiones generales.

Aspectos comparativos del proceso de morfogénesis en Geotrichum lactis y Endomyces geotrichum, por G. Gallego, A. Dura y J. R. Villanueva. (Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Salamanca.)

La caracterización morfológica y fisiológica de *Geotrichum lactis* como el estado asexual de *Endomyces geotrichum* ha permitido considerar al conjunto de ambos como un modelo adecuado para el estudio global del proceso de morfogénesis de este ascomiceto.

Se han caracterizado los diferentes estadios del ciclo vegetativo y estudiado la composición y estructura de sus paredes celulares mediante su análisis químico global y su fraccionamiento.

El aislamiento y caracterización de los diversos componentes macromoleculares de la pared celular ha demostrado la presencia de un complejo galactomanano-proteína y de un glucano soluble en álcali, como componentes cementantes; y la existencia de otro tipo de glucano (resistente a la extracción por tratamiento con álcali y ácido), que, junto

con la quitina, constituye el elemento estructural de las paredes celulares de los diferentes estadios.

Asimismo se ha detectado una actividad beta-(1-3)-glucanásica, que está ausente durante el período de crecimiento micelial y que aparece coincidiendo con la fragmentación del micelio en artrosporas. Se discute la implicación de tal actividad en algún proceso morfogénico del ciclo biológico.

Infección cruzada en un Centro de quemados, por F. Peco Krahe y R. de la Plaza. (Centro de Quemados y Cirugía Plástica de la Cruz Roja, Madrid.)

La infección en general es de gran importancia en la evolución del paciente quemado. Se revisan las fuentes más frecuentes de infección y los posibles riesgos de cruzamiento de las infecciones ya establecidas. Se marcan las diferencias fundamentales entre la infección en un Centro de Quemados y un Centro Quirúrgico de otro tipo, ya sean por el carácter de los pacientes, como por la dinámica del tratamiento en general.

Por último se revisan las condiciones de planificación en las edificaciones y se comparan distintos Centros modelos del mundo. Se presenta la zona construida en el Centro de Quemados y Cirugía Plástica de la Cruz Roja de Madrid para quemados graves y las disposiciones de control de la infección.

Sensibilidad de mutantes nalidíxico-resistentes de Proteus rettgeri atípico: aplicación terapéutica, por M. Gracia Rivas, M.^a P. Peña y M. Reig. (Ciudad Sanitaria "La Paz", Madrid.)

El aislamiento de una colonia crecida en el halo de bacteriostasis del ácido nalidíxico en un *Proteus rettgeri* B-gal (+) polirresistente (incluyendo kanamicina, gentamicina y fosfomicina) procedente de una bacteriouria crónica incontrolable en un enfermo con ureterostomía parietal, permitió observar que el mutante Nx-R, sin modificación de sus caracteres bioquímicos, adquiriría sensibilidad a la fosfomicina y kanamicina. Provocando en el mutante resistencia cromosómica a fosfomicina, no pudo recuperarse la sensibilidad al nalidíxico.

El fenómeno pudo ser reproducido *in vivo* seleccionando mutantes

nalidíxico y oxolínico-R por administración de ácido oxolínico y tratando posteriormente con fosfomicina (1 g/día) que negativizó el cultivo por primera vez en el enfermo, si bien a los 7 días fue seleccionada la mutante fosfomicin-R.

Se analiza el fenómeno por estudio de las curvas de crecimiento del *Proteus* salvaje en presencia y ausencia de 100 µg/ml de nalidíxico y se compara el efecto de la fosfomicina añadida en fases exponencial y de latencia. Se discuten las implicaciones genéticas de esta observación.

Infecciones por Pseudomonas aeruginosa, por R. Torio. (Residencia Sanitaria "Onésimo Redondo", Valladolid.)

El estudio incluye las infecciones hospitalarias habidas durante seis meses, aproximadamente. En este tiempo se han aislado 110 cepas. Se señala la incidencia de infecciones habidas por este germen en relación con *E. aureus* y otros gram-negativos. Las distintas cepas han sido clasificadas de acuerdo con su localización: urinaria, pulmonar, exudados, etc., señalando en cultivo puro o asociado. En un porcentaje alto de casos se encuentran antecedentes de instrumentalización o antibioterapia prolongada. La severidad de la infección es muy variable, desde simples comensales a infecciones graves. En los casos de muerte registrados se discute el papel desempeñado por el germen como acelerador del proceso. Los controles epidemiológicos para localizar la posible fuente resultaron negativos, siendo positivos en instrumental. Los piocinotipos hallados guardan relación con los aislamientos en distintos servicios. Se señalan los piocinotipos no incluidos en el esquema de Gillies y Govan. La sensibilidad a los antibióticos ensayados es casi constante. La mayor variación entre los antibióticos realmente útiles se encuentra en la carbenicilina y fosfomicina.

Aplicación y respuesta a los antibióticos en el Hospital, por P. Sánchez Calvo, Alvarez López y Ayuso Giner. (Sección de Bacteriología de la Residencia "Virgen de la Arrixaca", Alicante.)

Nuestro trabajo lo orientamos haciendo estadísticas recogidas al azar y divididas en tres grupos:

1) infecciones urinarias, 2) infecciones respiratorias puestas de manifiesto a través del cultivo de esputos, y 3) toda clase de heridas

fístulas, osteomielitis, etc.; mostrando la sensibilidad antibiótica en cada grupo para una determinada serie de gérmenes y antibióticos.

Para la realización del antibiograma seguimos las normas más ampliamente utilizadas de difusión en medio sólido con dilución del germen después de su aislamiento y siempre homogénea mediante bolas de vidrio estériles en medio de Muller-Hinton, de 5 mm de altura, en placas de 15 cm de diámetro.

Comparamos los mejores resultados de antibióticos *in vitro* para cinco grupos de gérmenes de los más habitualmente aislados.

Concentraciones inhibitoras mínimas de fosfomicina sobre distintas especies microbianas y líneas de regresión, por A. Rodríguez, S. Mochales, T. Olay y J. M. Mata. (Instituto de Farmacología Española, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.)

Se han determinado los valores de CIM de diferentes especies bacterianas por el método de dilución en agar recomendado por la OMS. Considerando que con la fosfomicina por vía parenteral se consiguen niveles sanguíneos de 60-70 µg/ml, se reseñan los porcentajes acumulativos de las especies estudiadas para una CIM de 64 µg/ml, es decir, susceptibles de un tratamiento con el antibiótico. Estos porcentajes son: *Staph. aureus* 97,3; *P. mirabilis* 98,0; *Serratia marcescens* 98,7; *Salmonella-Shigella*, 79,8; *E. coli* 86,5; *Ps. aeruginosa* 78,8; *Proteus indoligenos* 36,2; *Klebsiella-Enterobacter* 19,5, etc. Confrontando los valores de CIM con los diámetros de los halos de inhibición frente al disco de 50 µg de fosfomicina, se obtiene una gráfica por puntos, con las 311 cepas estudiadas, a la que se ha ajustado una línea de regresión con un coeficiente de correlación de 0,864. La gráfica señala que el halo de 15 mm separa claramente a los gérmenes sensibles, con una CIM de 64 µg/ml, o menos, de los resistentes, pudiendo considerarse con "sensibilidad intermedia" los comprendidos entre los halos de 12 y 15 mm.

Influencia de la cicloheximida en la regeneración de protoplastos de Pullularia pullulans, por S. Ramos, I. García-Acha y F. Uruburu. (Departamento de Microbiología, Instituto de Biología Molecular (CSIC), Facultad de Ciencias, Universidad de Salamanca.)

Al estudiar la morfogénesis de *Pullularia pullulans* se han obtenido protoplastos de su forma de levadura con el sistema enzimático produ-

cido por *Micromonospora chalcea* y se ha observado el proceso de regeneración en medio de Winge estabilizado osmóticamente. La cicloheximida se añadió a este medio a concentración de 20 µg/ml.

En ausencia de cicloheximida, la regeneración se inicia con formación de cadenas de células de pared aberrante, que a las 24 h han dado lugar a células normales. En presencia de cicloheximida, los protoplastos forman una "cáscara", que luego abandonan y no llegan a regenerar.

Al microscopio electrónico se ve, en ausencia de cicloheximida, que la regeneración se inicia con formación de una red de fibrillas que se va recubriendo de un material amorfo; en presencia de cicloheximida, este material es más tardío y escaso, sin llegar a recubrir nunca a las fibrillas.

Endocarditis por Corynebacterium, por M. R. Villanueva, L. Gaztelurrutia, F. Fernández Pérez y E. Cresto. (Servicio de Bacteriología y Serología, Ciudad Sanitaria "Francisco Franco", Barcelona.)

Revisamos 36 hemocultivos positivos a *Corynebacterium*, encontramos dos enfermos diagnosticados de endocarditis bacteriana, en los cuales se obtuvieron varios hemocultivos positivos y en los que podía descartarse una contaminación accidental. Se revisa la bibliografía y se establecen criterios diagnósticos y de patogenicidad. Se estudian bacteriológicamente los gérmenes aislados y se intenta su clasificación.

Estudio de la flora intestinal patógena en el medio pediátrico hospitalario, por P. Pavón y M. C. Castiñeiras. (Hospital General de Galicia, Santiago de Compostela.)

Hemos estudiado, durante los meses de enero a abril de 1973, 246 niños de edades comprendidas entre 0 y 2 años, ingresados en el Departamento de Pediatría del Hospital General de Galicia, que padecían gastroenteritis aguda. En el 33,05 %, el motivo de ingreso fue la diarrea y el 66,94 % estaban ingresados por otra causa.

Métodos

La investigación de la flora fecal se llevó a cabo mediante las técnicas siguientes:

- a) Inmunofluorescencia: se utilizó el isotiocianato de fluoresceína

anti- *E. coli*, monovalente, del "Instituto Pasteur", y el microscopio Zeiss de fluorescencia. b) Coprocultivo: se utilizaron los medios: tioglicolato, agar-sangre, cerebro-corazón y Levine, suministrados por Difco. c) Colitipificado: con sueros anti- *E. coli*, de la casa Difco. d) Antibiograma: por el método de difusión en placa con medio de Muller-Hinton.

Resultados

De los 246 niños estudiados, el 45,37 % no presentaron alteración en su flora a pesar de la diarrea. En el 54,62 % se identificó *E. coli* enteropatógeno, es decir, 133 niños del total. La cepa predominante fue el *E. coli* 0111:58B, que la llevaban el 94,74 % de niños, seguida de la *E. coli* 0119:69B, que la presentaban el 5,26 % de los niños. Este lo portaban los niños "no hospitalarios". Encontramos asociaciones no significativas con *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* y *Candida*.

El antibiograma demostró para el *E. coli* 0119 que el 100 % eran sensibles a la gentamicina, el 71,44 % lo eran a la rifampicina y el 71,44 % al abactrim (los 3 quimioterápicos más sensibles). Respecto al 0111, el 97,63 % fue sensible a la gentamicina, el 72,94 % lo fue a la rifampicina y el 64,94 % lo fue al abactrim.

El tratamiento se efectuó usando como antibiótico de base la gentamicina y asociado con un frenador intestinal.

La evolución fue favorable en el 98,8 % de los casos.

BIBLIOGRAFIA

GRUNDLAGEN DER GENETIK UND ZUCHTUNG INDUSTRIELL GENUTZTER MIKROORGANISMEN, por *Sos Isaakovic Alichanjan*. Traducción del original ruso "Selektzia Promyschlenych Mikroorganizmow". 1972. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 351 páginas y 111 figuras.

Como reza su título, "Fundamentos de genética y crianza de los microorganismos utilizados en la industria", esta obra va dirigida a los microbiólogos que están encargados de encontrar o producir, mantener y mejorar las razas de microbios que han de ser los protagonistas principales de las industrias de fermentación. He dicho para microbiólogos porque su lectura y manejo requiere una preparación microbiológica suficiente, aunque, dentro de la especialidad, expone la totalidad de la doctrina, desde el principio, por lo que se hace apto para los que quieran iniciarse en estas tareas de genética aplicada.

Empiezan a verse en el mercado de librería algunas obras de este tipo, aunque no llegan a la media docena. Su aparición se debe a que el tema interesa a un gran círculo industrial que utiliza a los microbios para demoler moléculas (obtención de disolventes), sintetizar otras (antibióticos, esteroides) u obtener biomasas (proteínas) y, por otro lado, a que la Genética microbiana permite lograr la crianza del microbio necesario mediante métodos científicos, lo que ha aumentado extraordinariamente el rendimiento de las industrias en que intervienen. Este aspecto de la Genética microbiana ha tenido tres pasos decisivos para su orientación: el descubrimiento de la acción mutágena de los rayos X y de los ultravioletas, el reconocimiento de la localización genotípica de las cualidades fisiológicas y la aclaración del principio de la regularización de la síntesis enzimática. Estas cuestiones se tratan con claridad y extensión suficientes para familiarizarse con el tema.

Aunque la presentación de la obra da la sensación de un escrito monotemático, en realidad tiene tres partes bien diferenciadas: la pri-

mera, dedicada a la Genética microbiana general, tiene 106 páginas; la segunda, a la crianza de razas microbianas, 102 páginas; la tercera, a la exposición minuciosa del proceso seguido para lograr las más célebres razas mundiales en las industrias de antibióticos, aminoácidos, vitaminas, enzimas, ácidos orgánicos y otros productos, con 100 páginas.

La literatura tiene 129 citas de trabajos en lengua rusa y 279 en otras lenguas. Naturalmente, se detiene en la fecha de la publicación del original ruso, pero, hasta ese momento es muy completa. Este aparato bibliográfico hace que el libro sirva de consulta histórica para docentes y escritores.

L. VILAS

QUIMICA Y BIOLOGIA DE LOS VIRUS, por *Heinz Fraenkel-Conrat* (versión española actualizada: Prof. J. R. Villanueva y Dra. Isabel García-Acha). 1972. Editorial Rueda, Madrid. XVIII + 328 páginas y 73 figuras.

Esta monografía es una puesta al día de la química y biología de los virus.

La obra está dividida en 13 capítulos, en los que se tratan temas de tanta trascendencia como las proteínas y los ácidos nucleicos de los virus, propiedades de las partículas de virus y naturaleza de la infección viral, mutagénesis y genética de los virus, replicación de los virus, biología de los fagos moderados, lisogenia y transducción, etc. Estos temas se tratan a nivel molecular, pero de una forma elemental y sencilla, por lo que su lectura es clara y está al alcance incluso de los no especializados.

Este libro es la traducción de la obra americana publicada en inglés en 1970, pero ha sido aumentada y puesta al día con manuscritos de la versión alemana de 1972 facilitados por el propio autor.

La versión al español ha sido muy bien realizada por el Prof. J. R. Villanueva y la Dra. I. García-Acha. La dificultad de traducción de muchos términos se ha soslayado conservando algunos de ellos en inglés (stacking, renaturation, stripping, top-component, et.), terminología que es familiar para la mayoría de los biólogos. Se utilizan, sin embargo, una serie de palabras admitidas en castellano por su uso y porque

por su etimología no presenta problemas, tales como: virión, viral, cápsida, nucleocápsida, capsómero, peplómero, etc. Una vez más conviene señalar la necesidad de que la Real Academia de la Lengua Española establezca comisiones científicas para la introducción de la nueva terminología técnica que se desarrolla con el progreso de las Ciencias. De esta forma se evitarían confusiones y la introducción de nuevos barbarismos.

El libro tiene abundancia de gráficas y esquemas, y magníficas microfotografías muy bien reproducidas.

F. RUIZ-FALCÓ

ROTLAUF, por Gerard Eissner y Friedrich Wilhelm Ewald. 1973. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena. 188 páginas y 12 figuras.

Esta publicación constituye la monografía número 13 de la serie titulada "Enfermedades infecciosas y su etiología", editada por R. Bieling, J. Kathe, W. Köhler y A. Mayr.

Aunque han transcurrido más de ochenta años desde el descubrimiento del *Erysipelothrix insidiosa*, agente causal del mal rojo del ganado porcino, enfermedad de gran importancia económica, sobre todo en tiempos pasados, no se conoce esta entidad patológica en todas sus manifestaciones, pese a los métodos de inmunización practicados.

El cuadro epidemiológico resulta más complejo que aquel que pudiera derivarse de la apreciación simple del animal sensible y bacteria productora. La problemática que ofrece el mal rojo no se resuelve exclusivamente con los métodos y consideraciones de la teoría infecciosa, a la luz de la Bacteriología tradicional.

Por ello, la monografía tiende a mostrar un cuadro que comprende, de una parte, y con la ayuda de una profusa bibliografía, la situación de los conocimientos actuales sobre esta zoonosis transmisible al hombre, y, de otra, la existencia de problemas de utilidad, que reclaman solución. La completa revisión del tema resulta de especial interés, como consecuencia de las explotaciones zootécnicas intensivas, donde la colectividad presenta una nueva patología.

La afección, clásicamente considerada como enfermedad del ganado porcino, alcanza paulatinamente importancia en la especie humana.

El texto se halla estructurado en las partes relativas a definición, resumen histórico, etiología, ecología, epidemiología, patogénesis, patología, sintomatología, clínica, terapéutica, profilaxis, inspección de carnes, mal rojo en el hombre y otras especies distintas a la porcina. Al propio tiempo, la etiología se trata bajo los aspectos de la sistemática, morfología, biología, métodos serológicos, diagnóstico bacteriológico y diferencial y disociación.

Un apéndice, asimismo con sus correspondientes citas bibliográficas, refiere los últimos trabajos publicados en el período transcurrido entre la redacción de la Memoria y su impresión.

Los temas actualizados sobre *E. insidiosa*, se refieren, entre otros, a su posición taxonómica, comportamiento frente al fenol y antibióticos, caracteres serológicos y químicos, producción de hialuronidasa, aislamiento en muestras sospechosas y a la vacunación, que conserva en el futuro su acción esencial en el control de la enfermedad animal.

La monografía aporta, pues, una valiosa documentación, no sólo al bacteriólogo, sino al patólogo.

M. RODRÍGUEZ-REBOLLO