TRABAJOS DE CONCURSO.

Estado actual de nuestros conocimientos acerca de los estreptococos.

Estreptococos hemolíticos y no hemolíticos.

Dr. Ernesto Cervera.

La propiedad hemolítica que tienen muchos estreptococos fué descubierta por Marmorek (1-2), quien observó en los conejos infectados con estos gérmenes un exudado hemorrágico, debido a la disolución de los glóbulos rojos. Bordet, en 1897 (3), observó el mismo fenómeno, y Besredka, en 1901 (4), demostró que los cultivos filtrados de estreptococo tenían también la propiedad hemolítica. Schottmuller, en 1903 (5), pensó que se podía aprovechar esta acción que tienen los estreptococos sobre los glóbulos rojos para su clasificación. Sembrando dichos gérmenes sobre placas de agar adicionado de 40% de sangre, y teniendo en cuenta el aspecto de las colonias, los agrupó en tres variedades:

Primera.—*Streptococus longua pathógenes o erysipelatis.*—Sus colonias están rodeadas de una zona clara de dos a tres milímetros de diámetro, en la cual los glóbulos rojos han desaparecido. Desde Rolly esta variedad se ha designado con el nombre de *streptococus hemolyticus* (6).

Segunda.—*Streptococus virídans o mitior.*—Sus colonias transforman la hemoglobina en metehemoglobina, y le comunican al medio una coloración verdosa; es lo que le ha valido la designación de *virídans.* Se le llama también *mitior* porque su virulencia para la raza humana y para los animales de experimentación es muy ligera comparada con la del *streptococus hemolyticus.*

Tercera.—*Streptococus mucosus.*—No tiene ninguna acción sobre los glóbulos rojos, y sus cultivos tienen un aspecto mucoso.

Si tenemos en cuenta que las bacterias de esta última variedad en su mayor parte son solubles en bilis, se ve que no se trata de verdaderos estreptococos, sino de neumococos. Además, los estudios recientes llevados a cabo en el Instituto Rockefeller para Investigaciones Médicas, han permitido clasificar estos gérmenes en el tipo III de neumococos fundándose en las reacciones inmunológicas.

James Howard Brown (7), en un estudio reciente titulado: *El uso del agar-sangre para el estudio de los estreptococos,* describe tres aspectos distintos de las colonias de estreptococos en las placas de agar-sangre:

Primero.—*Tipo alfa.*—A la simple vista las colonias profundas son pequeñas, de 0.8 de milímetro, biconvexas, verdosas, rodeadas por zonas de 1.3 mm. en los cuales los glóbulos presentan un color distintamente verdoso. Con un aumento de 7 a 8 diámetros, puede distinguirse alrededor de la zona verde, ligera hemolisis. Las colonias superficiales son redondas, planoconvexas, brillantes, algo verdosas a la luz trasmitida, grises con luz refleja, y con poca alteración aparente del medio que las rodea. Este tipo corresponde al *streptococus mitior* o *virídans* de Schottmuller.

Segundo.—*Tipo beta.*—Las colonias profundas están rodeadas por una zona perfectamente clara e incolora de hemolisis. Cuando se examinan con microscopio no se encuentran glóbulos rojos en el medio que rodea a las colonias. Las colonias mismas son grises, tanto con luz transmitida como con luz refleja. Los caracteres distintivos aparecen antes que los del tipo *alfa* y a menudo son bien claros en dieciocho horas a la temperatura del incubador. Las colonias superficiales tienen caracteres semejantes. Este tipo corresponde al *streptococus longus pathógenes o erysipelatis* de Schottmuller, al *streptococus hemolyticus* de Rolly y al *streptococus pyógenes* de Rosenbach (8).

Tercero.—*Tipo gama.*—Las colonias profundas y superficiales no producen ninguna zona perceptible de hemolisis o decoloración del medio que las rodea. Este tipo corresponde al *streptococus saprophyticus* de Mandelbaun (9) y al *streptococus anhemolyticus* de Zangemeinster. (10)

Describe también otros tipos intermediarios menos importantes recomendando para su estudio placas de 2 mm. de espesor de agar adicionado de 5% de sangre.

Admitiremos solamente como lo hacen muchos bacteriologistas contemporáneos, dos variedades: *estreptococos hemolíticos* y *no hemolíticos,* comprendiendo en el último grupo las razas de *virídans* y las indiferentes.

Los estreptococos hemolíticos se encuentran rara vez en los individuos sanos, son esencialmente patógenos, causan epidemias, se presentan en cadenas de micrococos, son débilmente positivos al Gram o pueden dejar de serlo cuando se les cultiva en agar-sangre, forman un sedimento grumoso con líquido claro cuando se les cultiva en caldo ordinario, se disuelven fácil y rápidamente en antiformina al 2%, fermentan menos que los no hemolíticos y muestran cierta predilección por la salicina, tardan cuando menos cuarenta y ocho horas en coagular la leche y forman un grupo perfectamente homogéneo, como lo han demostrado Kinsella y Swift (11), aplicando a su estudio el método de la desviación del complemento; es decir, que el antisuero de cada raza fija el complemento con el antígeno de todas las otras razas, y que el antígeno de cada raza fija el complemento con todos los antisueros.

Los no hemolíticos se encuentran en el polvo y frecuentemente en la boca de individuos sanos, no son una causa constante de enfermedad; para

que se vuelvan parásitos se necesita que encuentren un foco de menor resistencia, son parásitos facultativos como acertadamente los ha denominado Andrewes; comparados con los estreptococos hemolíticos son extremadamente inertes. Se presentan en cadenas de diplococos, son fuertemente positivos al Gram, pudiendo perder parcialmente esta propiedad cuando han pasado por el ratón; enturbian el caldo ordinario, se disuelven difícilmente en antiformina al 2%, fermentan con frecuencia la rafinosa y la inulina, substancias que los estreptococos hemolíticos fermentan rara vez; coagulan la leche en veinticuatro horas y forman un grupo heterogéneo, como han demostrado los autores antes mencionados (12) por el mismo método de la desviación del complemento.

No es mi intención tratar en este trabajo del papel patógeno tan variado de los estreptococos: sabemos muy bien que descubiertos por Pasteur y Doleris, en 1880, en la sangre de las enfermas atacadas de fiebre puerperal; por Ogston, Rosenbach y Passet en los abcesos calientes y los flemones; por Fehleisen en la erisipela; fueron encontrados más tarde en procesos patológicos tan distintos, que Peter llegó a llamar al estreptococo: *Microbe a tout faire.* Sólo quiero señalar aquellas enfermedades en que se han encontrado en estos últimos años.

Angina epidémica.—En mayo de 1911 se observaron en Boston 1,034 casos de esta enfermedad con 38 defunciones. En diciembre del mismo año, 10,000 casos en Chicago. En febrero y marzo de 1912, 3,000 casos en Baltimore con 30 defunciones. En 1915, en el Estado de Nueva York, y en 1915 en Monte Vernon, se presentaron epidemias semejantes.

Indudablemente existe una relación entre esta enfermedad y el consumo de la leche. Los primeros casos se presentan por lo general en las personas que toman la leche de un mismo establo, y esto coincide con casos semejantes en los individuos que manipulan la leche y con la existencia de una mastitis en las vacas lecheras. Unos opinan que el estreptococo de la mastitis es el que infecta la leche; otros creen que el germen no es de origen bovino sino humano, que procede de la garganta de los que ordeñan las vacas y que accidentalmente contaminan la leche; siendo ésta la opinión más reciente.

Savage (13) no ha conseguido producir la angina humana con estreptococos bovinos, y en cambio este autor, Davis, Capps (14) y Mathers (15), han producido una afección de la ubre de la vaca inyectando estreptococos hemolíticos humanos en los conductos galactóforos. Se han señalado diferencias entre estas dos variedades de estreptococos; el humano sería virulento para el conejo, más resistente a la acción del calor y fermentaría ciertos azúcares que no hace fermentar el bovino.

En todos estos casos se ha encontrado de una manera regular el estreptococo hemolítico en la garganta de los pacientes y en la leche consumida por ellos. Rosenow y Davis (16) señalaron la existencia constante de una cápsula en este organismo, lo consideraron como intermediario entre el *streptococus mucosus* y el *streptococus pyógenes,* y le dieron el nombre de *streptococus epidémicus;* pero es indudable que este no es un criterio suficiente para considerarlo como una variedad distinta, y el mismo Rosenow observó que cuando las razas crecían sobre agar perdían su cápsula, y que

luego la recobraban por un solo cultivo en leche. Por otra parte, Davis, en su artículo más reciente, considera el organismo como idéntico al *streptococus pyógenes.*

Bronconeumonía.—Que en la bronconeumonía consecutiva al sarampión y a la difteria los estreptococos se encuentran de una manera casi regular, y que la bronconeumonía había sido reproducida experimentalmente por Wollstein y Meltzer (17), haciendo insuflaciones intrabronquiales de cultivos de estreptococos en los perros, eran hechos conocidos; pero toda la atención de los bacteriologistas se despertó últimamente con la epidemia de bronconeumonía que se desarrolló en los campamentos militares americanos, de Illinois, Virginia, Texas y Michigan, ocasionando un gran número de víctimas. Esta epidemia se presentó inmediatamente después de los casos de neumonía lobar en octubre de 1917, y algunos pacientes presentaron al mismo tiempo una y otra enfermedades. Aproximadamente en un tercio de los casos se complicó de pleuresía purulenta y casi siempre fué consecutiva al sarampión. El estreptococo hemolítico es el germen que se ha encontrado en la mayoría de los casos y por tal razón se le concede el primer lugar como agente etiológico de la enfermedad. Alexander (18) encontró en sus primeros casos, dos tipos de estreptococo hemolítico, difiriendo uno de otro por su acción fermentativa sobre la manita y correspondiendo a los tipos *streptococus infrécuens* y *streptococus pyógenes,* de la clasificación de Holman. Sus observaciones han sido confirmadas por Kendall, quien estudió 58 razas de estreptococos hemolíticos en los campamentos militares, encontrando el *pyógenes* en 80% y el *infrécuens* en 20% de los casos.

Entre las muchas enseñanzas adquiridas en esta epidemia, tenemos la relativa a la importancia de los portadores de gérmenes para explicar el contagio. Irons y Marine (19) en el campamento Custer encontraron el estreptococo hemolítico en 70% de los individuos. Levi y Alexander (20), en los regimientos que fueron más azotados por la bronconeumonía, encontraron la enorme cifra de 89% de portadores de estreptococos. Cole examinó a los enfermos de sarampión en el momento de su ingreso al Hospital, encontrando que solamente 11.4% eran portadores de estreptococos hemolíticos, y repitiendo este examen de ocho a dieciséis días después de la admisión, encontró que la cifra se había elevado a 56.8%, por falta de aislamiento. Aprovechando estas enseñanzas se tomaron medidas muy cuidadosas en el campamento Z. Taylor, separando a los enfermos de sarampión que eran portadores de estreptococos hemolíticos, de aquellos que no tenían estos gérmenes en la garganta; en los primeros las complicaciones ocurrieron en 36.8% de los casos, mientras que en los segundos sólo se presentaron en 6.4%.

Sarampión.—Lo que acabamos de decir relativo a la bronconeumonía consecutiva al sarampión, nos ha demostrado con qué frecuencia se encuentran los estreptococos hemolíticos en esta fiebre eruptiva y en sus complicaciones; pero esto había sido considerado como un hecho vulgar, sin concederle más importancia que la que se les da a los gérmenes de infección secundaria. Sin embargo, en 1918 Tunnicliff (21), de 50 casos que publicó de sarampión y rubéola, en 42 encontró, sobre todo durante el período eruptivo de la enfermedad, una bacteria que en el primer cultivo y a menudo en los

cultivos subsecuentes, era anaerobia, y que el suero de los enfermos de sarampión tenía opsoninas para las razas aisladas del sarampión pero no para las de la rubéola, y viceversa; considerando a este organismo como una variedad de *streptococcus viridans*. El tiempo se encargará de decir si se le debe considerar algún carácter específico.

Escarlatina.—Sabida es la frecuencia con que se encuentran los estreptococos hemolíticos en la angina escarlatinosa, sobre todo en las formas graves, y la posibilidad de encontrar los mismos gérmenes en la sangre de los cadáveres de escarlatinosos. Moser y Pirquet (22) los consideraron como específicos fundándose en la propiedad que tiene el suero de los enfermos atacados de escarlatina de aglutinar los estreptococos de esta fiebre eruptiva, pero sin acción aglutinante sobre los estreptococos de la garganta normal. Sin embargo, Weaver (23) considera que esta aglutinación no tiene nada de específica porque estudiando sueros de enfermos de escarlatina, neumonía, erisipela, sarampión, endocarditis, fiebre tifoidea y otras enfermedades, con estreptococos aislados de casos de escarlatina, fiebre puerperal, endocarditis ulcerosa y peritonitis, no encontró que los estreptococos de la escarlatina se condujeran de una manera especial. Iogichés (24) es de la misma opinión, porque ha visto que el suero de los escarlatinosos aglutina con la misma intensidad los estreptococos de la escarlatina que los de otros padecimientos. Por último, Zelenski (25) ha señalado que la mayor parte de los estreptococos son aglutinados por el suero humano normal, cosa que no nos extraña, conocida la tendencia que tienen los estreptococos a la aglutinación espontánea. Por consiguiente, no es a la aglutinación a la que se debe recurrir cuando se trata de determinar el carácter específico de un estreptococo, sino a la reacción de fijación del complemento. Es precisamente lo que han hecho Besredka y Dopter (26), quienes recogieron sueros en diversos períodos de la escarlatina y los ensayaron con diversas muestras de estreptococos aislados de casos auténticos de esta enfermedad. Ahora bien, los resultados obtenidos por estos bacteriologistas han sido completamente negativos.

La eficacia del suero antiescarlatinoso de Moser, preparado con varias razas de estreptococos procedentes de escarlatinosos, ha sido muy discutida. Entre sus partidarios debemos citar a Bokay y Escherich, quien comunicó al Congreso de Madrid que con el empleo del suero de Moser la mortalidad por escarlatina había bajado de 16.41 a 6.70%, y recomienda emplear dosis de 10 a 200 c. c. desde el principio de la enfermedad; a Bujwid y Gertler (27), los cuales opinan que el suero ha hecho disminuir la mortalidad tres veces aproximadamente, y Schick (28), quien, después de relatar los resultados de sus observaciones en la Clínica de Viena, manifestó lo bien impresionado que quedó con el suero, e hizo votos porque su uso se generalizase por todo el mundo. Entre los adversarios, mencionaremos a Moltchanoff, de Moscow, quien opina que el suero no evita las complicaciones y que de una manera general no influye sobre el curso de la enfermedad; y Bilik, que asegura que el suero está desprovisto de toda acción específica.

Para terminar lo relativo al poder específico de los estreptococos de la escarlatina, dejaremos consignado que Landsteiner ha logrado reproducir esta enfermedad en los monos con inyecciones de sangre de escarlatinosos,

y no ha logrado conseguirlo, inyectándoles razas de estreptococos aislados en casos de escarlatina.

REUMATISMO.—Westphal (29), Wassermann y Malkoff aislaron el estreptococo en un caso de reumatismo con corea, y produjeron con él artritis en los conejos. Poynton y Paine (30) aislaron en esta afección una forma de *streptococcus viridans* y le dieron el nombre de *diplococcus reumáticus,* considerándolo como específico. Kinsella aisló el *streptococcus viridans* en un caso de endocarditis subaguda y demostró la existencia de anticuerpos específicos en el suero de los pacientes. Quigley (31) ha encontrado el mismo estreptococo diez veces en 21 casos de corea que estudió. Sin embargo, la acción específica de estos gérmenes no está demostrada, porque Menzer (32), Cole (33) y otros experimentadores han demostrado que con razas de estreptococos que no proceden de casos de reumatismo, también se pueden producir artritis en los animales de laboratorio.

POLIOMIELITIS ANTERIOR AGUDA.—En 1916, Mathers (34), Nuzun (35), Herzog, Rosenow (36) y Towne, han aislado estreptococos del sistema nervioso central y otros tejidos así como también del líquido céfalorraquídeo en los enfermos atacados de poliomielitis anterior aguda. Como en 1913 Flexner y Noguchi (37) habían descrito un virus filtrable en esta enfermedad, cabe preguntarse si existe alguna relación entre los trabajos de dichos bacteriologistas. Heist, Solis-Cohen, Kolmer (38), Rosenow y Wheeler (39), haciendo crecer el estreptococo a cubierto del aire, ha obtenido una forma filtrable, con cuerpos parecidos a los descritos por Flexner y Noguchi. Así quedarían conciliadas las investigaciones recientes con la de 1913. Rosenow considera este estreptococo como específico y dice haber reproducido la enfermedad experimentalmente en los cuyes, perros, gatos y monos. Mathers y Howell (40) han encontrado en el suero de los conejos inmunizados, opsoninas que sólo reaccionan con estos estreptococos. Rosenow y Gray han encontrado los mismos anticuerpos en los monos convalecientes. Heist y Solis-Cohen los han demostrado en el suero de los enfermos. Inmunizando caballos con estos estreptococos se ha obtenido un suero que Nuzum y Willy (41) han empleado con buen éxito en los monos infectados con el virus de la poliomielitis, y Rosenow ha obtenido resultados semejantes tanto en los monos infectados como en el hombre. En 51 casos tratados por inyecciones intravenosas de suero, la mortalidad fué, aproximadamente, de 6%. En cambio, en 25 casos no tratados por el suero, la mortalidad fué de 35%. Inyectando el suero desde el principio de la enfermedad se evitarían las parálisis que con tanta frecuencia se presentan en aquellos casos en que no se utiliza la sueroterapia.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS HEMOLÍTICOS.—Una comisión formada por W. L. Holman (42), Oswald T. Avery, R. A. Kinsella y J. Howard Brown, ha recomendado un procedimiento para aislar e identificar los estreptococos hemolíticos procedentes de la garganta, los esputos y otros exudados patológicos. Haremos un breve resumen de la técnica aconsejada por dicha comisión.

Los exudados de la garganta se recogen con escobillones esterilizados. Los esputos y el pus se reciben en frascos o tubos estériles. El material se

envía inmediatamente al laboratorio y se guarda en refrigerador hasta que se hace la siembra. Se humedecen los escobillones con una gota de solución salina estéril, se toca una placa de agar-sangre y luego se extiende uniformemente el producto con una asa de platino, hasta los puntos más distantes del lugar tocado, con el objeto de asegurar la mayor diseminación posible. Después se hacen unas estrías con el asa de platino para tener también colonias profundas. Otra manera de conseguirlo consiste en diluir convenientemente el material y sembrarlo en un tubo de agar-sangre que se mantiene fundido a la temperatura de 45 a 50 grados C., y luego se vacía en cajas de Petri. Las placas se incuban a 37 grados C. y en posición invertida durante dieciocho o veinticuatro horas, manteniendo húmeda la atmósfera del incubador por la evaporación de cierta cantidad de agua que se pone en una caja de Petri en el piso de la estufa. Luego se buscan las colonias aisladas, transparentes y rodeadas de una zona de hemolisis; se examinan con microscopio a poco aumento para cerciorarse de que cerca de ellas no existen corpúsculos de color verdoso o moreno. Una de estas colonias características se siembra en un tubo de caldo, y cuando el cultivo se ha desarrollado se hace una coloración por el método de Gram y se estudia la longitud de las cadenas, el tamaño, forma y disposición de los cocos en dichas cadenas y las otras peculiaridades que puedan llamar la atención. Después se siembra otro tubo de caldo para conservar el cultivo y con el contenido del primer tubo se estudian la hemolisis y la solubilidad en bilis. Para lo primero se mezclan 0.5 c.c. del cultivo en caldo con 0.5 c.c. de una suspensión de glóbulos rojos de conejo, lavados en solución salina fisiológica, al 5%, y se ponen en baño de María a 37 grados C., por dos horas. Los estreptococos hemolíticos de origen humano disuelven los glóbulos rojos en este tiempo. Para lo segundo, se añade a 1 c.c. del cultivo en caldo un 1|5 de su volumen de bilis de toro esterilizada y se deja a la temperatura del laboratorio o se pone a la estufa a 37 grados. La solubilidad en bilis es un procedimiento fundamental que permite distinguir de una manera segura los neumococos de los estreptococos. Se estudia en seguida la fermentación de la lactosa, manita, salicina, inulina, rafinosa y sacarosa. Después se siembra un tubo de leche y se incuba durante siete días, estudiándose si la coagulación es rápida o lenta, y en el caso de que no haya coagulación, se sumerge el tubo durante diez minutos en agua hirviendo para ver si el fenómeno se produce. En fin, para completar el estudio se hace una inoculación intravenosa en conejo y otra intraperitoneal en ratón.

La gelosa que se emplea es al 2% y su reacción debe ser neutra o normal ácida al 0.5% a la fenoltaleína, después de esterilización. Se recomienda muy especialmente que no se le añada al medio dextrosa ni otras substancias susceptibles de fermentar.

Puede usarse sangre desfibrinada humana, de caballo o de conejo, que puede conservarse en refrigerador por varios días; pero si hay algo de hemolisis o si los glóbulos están tan aglutinados que sea difícil ponerlos en suspensión, esta sangre ya no deberá usarse.

Para hacer la mezcla de la sangre con la gelosa, se funde esta última, se deja enfriar de 45 a 50 grados C., se le añade 5 a 10% de sangre y se

mezcla cuidadosamente, dejándola solidificarse en tubos inclinados o bien vaciándola en cajas de Petri, de 9 cent. de diámetro. Para obtener placas de 2 a 3 mm. de espesor, se pondrá en cada caja 12 a 15 c.c. de agar-sangre. Las placas deberán utilizarse lo más pronto posible, porque si se seca un poco su superficie, los estreptococos no se desarrollan rápidamente, y si las cajas se dejan mucho tiempo en el refrigerador, la humedad puede ser causa de confluencia de las colonias.

El caldo tiene la composición habitual; se recomienda muy especialmente que no se le agregue dextrosa, suero, ni líquido de ascitis. Su reacción no debe pasar de 0.5% normal ácida a la fenoltaleína y el medio debe estar recientemente preparado.

La bilis de toro empleada para estudiar la solubilidad debe ser fresca; se esteriliza en autoclave, se filtra a través de papel, se reparte en tubos y se esteriliza nuevamente en autoclave.

Los cultivos se conservan por varias semanas a la temperatura del laboratorio en tubos de gelosa o de caldo que contengan una pequeña cantidad de sangre.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS ESTREPTOCOCOS NO HEMOLÍTICOS —Ya sabemos que es fácil reconocer las colonias de estreptococos *viridans* y las de estreptococos indiferentes por el aspecto que presentan sus colonias sobre la placa de agar-sangre; su identificación se completa estudiando su acción sobre una suspensión de glóbulos rojos al 5%, su insolubilidad en bilis, sus propiedades fermentativas, su acción sobre la leche y su poca acción patógena para los animales de laboratorio. Por tener algo de especial, vamos a describir la técnica que aconseja E. C. Rosenow para obtener cultivos de las articulaciones en los casos de reumatismo articular agudo.

Se prepara una gelosa al 2%, cuya reacción sea de 0.4 a 0.6% normal ácida a la fenoltaleína. Se le agrega de 0.2 a 1% de dextrosa. Se reparte a razón de 7 a 8 c.c. por tubo. Se hierven estos tubos por algunos minutos para expeler el oxígeno absorbido. Se deja enfriar su contenido a 50 grados C. Se le añade a cada tubo 2 ó 3 c.c. del líquido de ascitis estéril y el cual ha sido calentado previamente a 60 grados C. por veinticuatro horas. Se dejan enfriar a 40 grados C. y se siembran con 1 c.c. del líquido obtenido de la articulación con una jeringa estéril. Se ponen en agua fría para que se solidifique rápidamente su contenido y se colocan en el incubador. Así puede crecer el estreptococo sin oxígeno en las capas profundas del medio, lo cual favorece su desarrollo.

RELACIÓN ENTRE LOS ESTREPTOCOCOS HEMOLÍTICOS Y LOS NO HEMOLÍTICOS. —Hemos mencionado los trabajos de Kinsella. Este sabio, en colaboración con Swift, estudió primero veintiocho razas de estreptococos no hemolíticos por el método de la desviación del complemento, y no encontró dos razas que fueran absolutamente idénticas, llegando a la conclusión de que este grupo de estreptococos es muy heterogéneo. Luego estudió veintiocho razas de estreptococos hemolíticos procedentes de distintos procesos patológicos, siempre por el mismo método de la desviación del complemento, y vió que el grupo hemolítico es perfectamente homogéneo. La técnica que siguió en su último trabajo es la siguiente: inmunizó cone-

jos con cultivos frescos en caldo de estreptococos, calentándolos una hora a 56 grados C. La primera inyección fué de 1 c.c. de cultivo, la segunda de 2 c.c., la tercera de 5 c.c., la cuarta de 10 c.c., y la quinta de 20 c.c., y aplicó luego otra serie semejante de inyecciones. Los intervalos fueron de cuatro días, y tan pronto como un suero fijaba el complemento con su propio antígeno, era ensayado con los otros veintisiete antígenos. Empleó de antígeno 0.05 c.c., de complemento y de amboceptor anticarnero, 2 unidades, y de suero inmune, dosis decrecientes de 0.1 c.c., 0.05 c.c. y 0.025 c.c. Las mezclas de antígeno, complemento y suero inmune fueron llevadas a un volumen de 1.5 c.c. con suero artificial y se pusieron en baño de María a 37 grados C. por una hora. Luego se agregaron 0.5 c.c. de amboceptor diluído (dos unidades) y 0.5 c.c. de suspensión de glóbulos de carnero al 5%; se agitaron los tubos y se pusieron otra vez a 37 grados una hora.

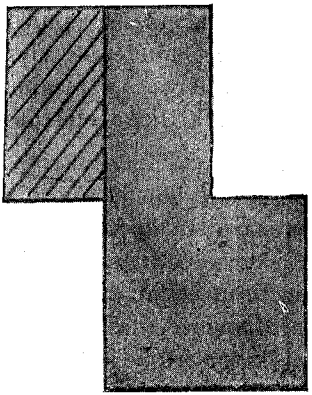
Para preparar el antígeno se secó en el vacío el sedimento lavado de un cultivo de veinticuatro horas de estreptococo en caldo; se pulverizó y se disolvieron diez miligramos de este polvo en 5 c.c. de una solución de antiformina al 2%; haciendo esta operación en el baño de María a 56 grados C. Luego se neutralizó la solución con ácido sulfúrico decinormal y empleando como indicador el papel de tornasol. Se eliminó el cloro libre añadiendo dos gotas de tiosulfato de sodio al 5%. La solución se llevó entonces a 10 c.c. con suero artificial fenicado, de tal manera que 1 c.c. de antígeno representase un miligramo de polvo de estreptococos.

Posteriormente trató de averiguar R. Kinsella si el mismo método de la desviación del complemento le permitiría establecer una relación entre los dos grupos de estreptococos. Ensayó primero el suero inmune preparado con estreptococos hemolíticos, buscando la acción que podía tener sobre las razas no hemolíticas, y observó que de las dieciocho razas no hemolíticas estudiadas, ocho fijaron el complemento y diez no lo fijaron. Después analizó dos sueros inmunes preparados con los estreptococos no hemolíticos que habían fijado el complemento en el experimento anterior, haciéndolos obrar sobre antígenos hemolíticos; el resultado fué que se obtuvieron reacciones positivas, aunque algunas veces débiles. Por último, ensayó tres sueros inmunes preparados con estreptococos no hemolíticos de los que no habían fijado el complemento; los hizo obrar sobre antígenos hemolíticos y obtuvo puras reacciones negativas.

De aquí deduce que existe evidentemente una relación entre los dos grupos de estreptococos, y que la variabilidad del grupo no hemolítico depende de que se encuentran en él dos elementos opuestos; debiéndose la individualidad de cada miembro a la preponderancia de uno u otro de estos factores. Convencionalmente llama a uno de ellos *el lado derecho,* y al otro *el lado izquierdo* del grupo; siendo este último el que sirve de lazo de unión entre los dos.

El siguiente esquema, tomado del autor, de una idea gráfica de las relaciones existentes entre las dos variedades de estreptococos.

Estreptococos hemolíticos.



Estreptococos no hemolíticos.

Por último, Kinsella termina su artículo estableciendo analogías entre los estreptococos, los neumococos y las bacterias pertenecientes al grupo colitífico. El grupo I de neumococos es una variedad única; no se encuentra en la garganta normal y es muy patógeno. El grupo IV, por el contrario, es una variedad heterogénea; existe en la garganta normal y es considerado como el menos patógeno de los tipos de neumococos. El bacilo tífico es una variedad casi homogénea; no existe en individuos normales, y es muy patógeno. El colibacilo es una variedad heterogénea, al menos por las reacciones de fermentación; existe en individuos normales y es menos patógeno. Tal parece que los grupos homogéneos de bacterias son más nocivos que los heterogéneos.

Conciliación posible entre las doctrinas unicista y pluralista.—Marmorek admitió la unidad de los estreptococos fundándose en tres razones:

Primera.—Todos los estreptococos son hemolíticos.

Segunda.—Ningún estreptococo puede germinar en el medio de cultivo filtrado de otro estreptococo. (Medios vacunados).

Tercera.—Un suero antiestreptocócico monovalente es activo contra todos los estreptococos.

Tal es el *tripié* del unicismo. Sólo el estreptococo del muermo formaría una especie aparte porque se cultiva en un filtrado estreptocócico y el suero no tiene ninguna acción sobre él.

Se ve inmediatamente que Marmorek sólo trabajó con estreptococos hemolíticos (más de cuarenta muestras); es decir, con la variedad homogénea de estreptococos. El segundo argumento, o sea la incapacidad del estreptococo para desarrollarse en un cultivo de caldo filtrado de estreptococo, mientras que en las mismas condiciones el estafilococo o el neumococo dan cultivos abundantes, no es cierto en todos los casos, porque los estreptococos de la escarlatina pueden crecer, aunque no muy bien, en estas circunstancias. Por otra parte, James Howard Brown, en su reciente monografía ya citada, demuestra por una serie de experimentos, que la reacción de Marmorek no

tiene nada de específica, porque el bacilo *coli*, por ejemplo, puede volver al caldo impropio para el desarrollo de un germen tan distinto como es el neumococo, y cree que la capacidad de un estreptococo o de cualquier otro organismo para crecer en un medio donde ha vivido otra bacteria, depende de la aptitud del primero para tolerar los productos del metabolismo de la bacteria de que se trata, o para utilizar ciertas substancias nutritivas no aprovechadas por ella.

El tercer argumento, es decir, que el suero preparado con un solo estreptococo virulento preserva contra toda infección estreptocócica, tampoco puede defenderse porque Mery (43) con su estreptococo aislado de un niño enfermo de escarlatina, produjo una infección mortal tanto en los animales inyectados con el suero como en los testigos; y J. Courmont (44) estudiando el estreptococo de Marmorek y seis más, encontró que el suero de Marmorek sólo obraba sobre el estreptococo de dicho autor, careciendo de acción sobre las otras razas. Por desgracia no se especifica si estos estudios han sido hechos con estreptococos hemolíticos. Sin embargo, ya hemos visto que Marmorek sólo trabajó con estreptococos hemolíticos, y lo que hasta cierto punto puede explicar la uniformidad de los resultados obtenidos; inclinándonos a creer que si este sabio hubiera experimentado también con razas no hemolíticas, habría acabado por admitir la pluralidad de los estreptococos. Sus ideas han de haber variado más tarde, porque renunció al suero monovalente y su última preparación es una mezcla de dos sueros distintos: uno proviene de caballos inoculados con la toxina y el otro es obtenido por inoculación de cuarenta y dos muestras de estreptococos de distinta procedencia.

Recientemente Aronson (45) ha sostenido que su suero monovalente, preparado inmunizando los caballos con un solo estreptococo que ha vuelto muy virulento pasándolo de ratón a ratón, protege contra todos los estreptococos cualquiera que sea su procedencia.

Besredka explica las conclusiones de Aronson diciendo que al pasar los estreptococos repetidas veces por los ratones para hacerlos virulentos, les ha quitado su individualidad, transformándolos en una sola especie; de tal manera que los ensayos hechos con estreptococos de la escarlatina y de otras enfermedades, se han efectuado en realidad con un solo estreptococo, el del ratón, es decir, con un estreptococo de paso. La mejor prueba de que Besredka está en lo justo, es que cuando Aronson experimentó con un estreptococo que inmediatamente es patógeno para los ratones, como acontece con el del muermo, el suero fué inactivo, y sólo se mostró eficaz cuando se pasó este microbio varias veces por el ratón, es decir, cuando perdió sus cualidades originales. Es de creerse que actualmente Aronson está convencido de la diversidad de estreptococos, porque para preparar su suero se sirve ahora no solamente del estreptococo virulento a que hemos aludido, sino también de otros que no han pasado por los animales de laboratorio.

Objeciones semejantes le hace a otro de los últimos campeones del unicismo, Neufeld (46), quien afirma que con un estreptococo procedente de un flemón, ha logrado preparar un suero que también es activo para el es-

treptococo de Aronson, aislado de la escarlatina y para el de Marmorek, aislado de una angina.

Observaciones personales.—Hemos aislado estreptococos de los esputos, de los exudados de la garganta, del pus pleural, del pus vaginal, del pus del oído y de la sangre. Hemos hecho la diferenciación en placas de agar-sangre para ver si se trataba de la variedad hemolítica o de la no hemolítica. Partiendo de una sola colonia perfectamente aislada, se ha hecho la siembra en caldo adicionado de un cubito de albúmina de huevo coagulada. Con el cultivo de veinticuatro horas, después de apreciar los caracteres macroscópicos, se han hecho preparaciones por el método de Gram anotando la longitud, el aspecto y la disposición de las cadenas entre sí. Se ha estudiado la solubilidad en bilis para saber si se trataba de verdaderos estreptococos; y así hemos podido eliminar algunos neumococos agrupados en cadena. Hemos hecho la investigación de la hemolisis con glóbulos rojos humanos, de conejo y de carnero. Se han hecho siembras en leche, anotando el tiempo en que se verificaba la coagulación.

Para la preparación de los medios de cultivo y para las pruebas de solubilidad en bilis y de hemolisis, nos hemos sujetado a las recomendaciones de la Comisión Americana que ya hemos citado anteriormente; pero en vez de emplear el caldo ordinario solo, lo hemos usado agregándole un cubito de albúmina de huevo coagulada, por ser este medio más favorable para el desarrollo de los estreptococos.

Era nuestra intención emprender estudios de fermentación con inulina, lactosa, manita, salicina y rafinosa; inoculaciones al ratón y al conejo e investigaciones inmunológicas; pero ha sido muy limitado el tiempo de que hemos dispuesto para escribir este trabajo, y no siempre hemos tenido todos los elementos a nuestra disposición.

Creemos dar mejor idea de nuestra humilde labor consignando en un cuadro las observaciones recogidas.

México, 31 de mayo de 1919.

BIBLIOGRAFÍA.

1—MARMOREK, A.—*Le Streptocoque et le sérum antistreptococcique. Annales Pasteur*, 1895.

2—MARMOREK, A.—*La toxine streptococcique. Annales de l'Institute Pas teur*, 1902, XVI, 169.

3—BORDET, J.—*Contribution à l'etude du sérum antistreptococcique. Annales Pasteur*, 1897, XI, 177.

4—BESREDKA, A.—*Médicaments microbiens. Bibliothèque de Thérapeutique-Gilbert et Carnot. Baillière Fils.* Paris, 1907.

5—SCHOTTMULLER.—*Die Artunterscheidung der fur den Menschen Patho. genen Streptokokken durch Blut Agar. Munchen. Med-Wchnschr.*, 1903, L, 849.

6—ROLLY, FR.—*Experimentelle bakteriologische Untersuchungen von verschied enen Streptokokkenstammnen. Centr. Bacteriol., 1te. Abt. Orig.*, 1012, LXI, 86.

7—BROWN, H. J.—*The use of blood agar for the study of streptococcy. Monographs of the Rockefeller Institute for Medical Research. January* 21, 1019.

8—ROSENBACH, A. J. F.—*Microorganismen bei Wundinfektionskrankheiten des Menchen.* Wiesbaden, 1884.

9—MANDELBAUM, M.—*Zur streptokokkenfrage. Z. Hyg., u. Infectionskrankh.*, 1907-08, LVIII, 26.

10—ZANGEMEISTER, W.—*Ueber der Verbreitung der streptokokken im Hinblick auf ihre infektiositat und ihre hemolytische Eigenschaft. Munch. Med. Woch.*, 1910, LCII, 1268.

11—KINSELLA, R. A. y S. WIFT, H. F.—*J. Exp. Med.*, 1918, XXVIII, 169.

12—KINSELLA, R. A. y S. WIFT, H. F.—*J. Exp. Med.*, 1917, XXV, 877.

13—SAVAGE, W. G.—*Milk and the public Health. Mac Millan*, 1912, p. 1107.

14—DAVIS, D. J., *and* CAPPS, J. A.—*Experimental bovine Mastitis produced with hemolytic Streptococci of human Origin. Jour. Infec. Dis.*, 1914, XV, 135.

15—MATHERS, G.—*Different Types of Streptococci and their Relation to bovine Mastitis. Jour. Infec. Dis.*, 1916, XIX, 222.

16—DAVIS, D. J. *and* ROSENOW, E. C.—*An Epidemic of Sore Throat due to a peculiar Streptococcus. Jour. Am. Med. Assn.*, 1912, LVIII, 773.

17—WOLLSTEIN, N. *and* MELTZER, S. J.—*Experimental Bronchoneumonia by intrabronchial Insufflation. Jour. Exper. Med.*, 1912, XVI, 126.

17—WOLLSTEIN, N. *and* MELTZER, S. J.—*Pneumonic Lesions produced by Streptococcus. Jour. Exper. Med.*, 1915, XVIII, 548.

18—ALEXANDER, H. L.—*Hemolytic Streptococcus causing severe Infections at Camp Zachary Taylor. Ky. Jour Am. Med. Assn.*, 1918, LXX, 775.

19—Irons, E. E. *and* Marine, D.—*Streptococcal Infections following Measles and other Diseases. Jour. Am. Med. Assn.*, 1918, LXX, 697.

20—Levi, R. L. *and* Alexander, H. L.—*The Predisposition of Streptococcus Corricarriers to the Complications of Measles. Jour. Am. Med. Assn.*, 1918, LXX, 1827.

21—Tunnicliff, R.—*The Cultivation of a Micrococcus from Blood in Preeruptive Estages of Measles. Jour. Am. Med. Assn.*, 1917, LXXII, 1028.

21—Tunnicliff, R.—*Observations on the Bacteriology and Inmune Reactions of Rubeol (Measles) and Rubella (German Measles). Jour. Infec. Dis.*, 1918, XXII, 462.

22—Moser, P. *and* Von Pirquet, C.—*Zur Agglutination der Streptokokken. Centralbl f. Bakteriol.*, 1905, XXXIX, pp. 560, 714.

23—Weaver, G. H.—*Agglutination of streptococci, especially those cultivated from Cases of Scarlatina, by human Sera. Jour. Infec. Dis.*, 1912, X, 321.

24—Iogichés.—*Centralbl f. Bakter.*, I. Orig., T. XXXVI, p. 692.

25—Zelenski, T.—*Zur Agglutination der Streptokokken. Wien. Clin. Wchnschr.*, 1904, XVII, 406.

26—Besredka, A. *and* Dopter.—*Contribution à l'étude du rôle des streptocoques au cours de la scarlatine. Annales Pasteur*, 1904, XVIII, 373.

27—Bujwid y Gertler, L.—*Przeglad Lekarski*, 1903, P. 87.

28—Schick.—*Deutsche Mediz. Wochenschr.*, 1905, P. 2092.

29—Westphall, Wassermann *and* Malkoff.—*Ueber den Infectiosen Charackter und Zusammenhang von acuten Gelenkrheumatismus und Chorea, Berl. Klin Wchnschr.*, 1899, XXXVI, 638.

30—Poynton y Paine.—*Etiology of Rheumatic Fever. Lancet, London*, 1900, P. 860, 932.

31—Quigley, W. J.—*Observations on the Bacteriology of Chorea. Jour Infec. Dis.*, 1918, XXII.

32—Menzer, A.—*Die Aetiologie des Acuten Gelenkrheumatismos.* Berlin, 1902.

33—Cole, R. E.—*Experimental Streptococcus Arthritis in Relation to the Etiology of acute Articular Rheumatism. Jour Infec. Dis.*, 1904, I. 714.

34—Mathers, G.—*Some Bacteriologic observations on Epidemic Poliomyelitis. Jour. Am. Med. Assn.*, 1916, LXVII, 1019.

35—Nuzum, J. W. *and* Herzog, M.—*Experimental Studies in the Etiology of acute Epidemic Poliomyelitis. Jour. An. Med. Assn.*, 1916, LXVII, 1204.

36—Rosenow, E. C. *and* Towne, E. V.—*Bacteriological observations in experimental Poliomyelitis of Monkeys. Jour. Med. Research.* 1917, XXXVI, 175.

37—Flexner, S. *and* Noguchi, H.—*Experiments on the Cultivation of the Microorganism Causing epidemic Poliomyelitis. Jour. Exper. Med.*, 1913, XVIII, 461.

38—HEIST, G. D., SOLIS-COHEN, M. *and* KOLMER, J. A.—*Studies in Epidemic Poliomyelitis. The Isolation and Cultivation of the Globoides. Jour. Infec. Dis.*, 1918, XXII, 169.

38—HEIST, G. D., SOLIS-COHEN, M. *and* KOLMER, J. A.—*Studies in Epidemic Poliomyelitis. III. Comparative Studies of Cocci isolated from Poliomyelitis. Jour. Inf. Dis.*, 1918, XVII, 182.

39—ROSENOW, E. C. *and* WHEELER, C. W.—*The Etiology of epidemic Poliomyelitis. Jour. Inf. Dis.*, 1918, XXII, 281.

40—MATHERS, G. *and* HOWELL, K.—*Inmune reactions in rabbits injected with micrococci from acute Poliomyelitis. Jour. Infec. Dis.* 1917, XXI, 292.

41—NUZUM, J. W. *and* WILLY, R. G.—*Further Studies of an antipoliomyelitis Serum, its protective and curative Properties in experimental Poliomyelitis of Monkeys. Jour. Infec. Dis.*, 1918, XXII, 258.

42—HOLMEN, W. L., OSWALD, T. AVERY, R. A. KINSELLA *y* J. HOWARD BROWN.—*Recomendations of the Committee on an Standard Routine Method for the Isolation and Identification of hemolytic Streptococci from Throats, Sputa, and pathologic Exudates. Jour. of Labor. and Clin. Med.*, P. 618. *July*, 1918. No. 10 V. III.

43—MERY.—*Compt. rend. soc. Biologie*, 1896.

44—COURMONT, J.—*Compt. rend. soc. Biologie*, 1898.

45—ARONSON.—*Berlin. Klin. Woch.*, 1902. P. 979, 1006. *Deutsche Medizinische Woch.*, 1903, P. 439.

46—NEUFELD.—*Zeitschs. f. Hyg. 1903.*