
VOLUMEN 23. 1970

JULIO - SEPTIEMBRE. NUMERO 3

Microbiología Española

Revista

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



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Toda la correspondencia para MICROBIOLOGÍA ESPAÑOLA debe dirigirse a

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

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

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

Número: España, 60 PTA; extranjero, 90 PTA



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

Vicedirectores: Dr. Gonzalo Urgoiti, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Miguel Rubio, Jefe de Departamento del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

Secretario: Dr. Luis Sánchez, Jefe del Servicio de Publicaciones del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología.

INDICE

	<u>Página</u>
Estudios sobre la estandarización de las reacciones serológicas utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis, por <i>A. Foz</i> ...	159
Ultraestructura y composición química de las paredes celulares del <i>Micrococcus morrhuae</i> , halófilo obligado, por <i>M. Santaolalla</i> y <i>M. Rodríguez-Rebollo</i>	179
Determinación cualitativa de aminoácidos y azúcares libres en hoja de cebada sana e infectada con la roya, por <i>F. D. Calonge</i>	195
Sensibilidad de la cepa «Ferrán», de células de riñón de cerdo, a su infección por virus, por <i>Carmen Gil-Fernández</i>	203

HOSPITAL MUNICIPAL DE NTRA. SRA. DEL MAR (INFECCIOSOS). BARCELONA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACION
SECCION DE BACTERIOLOGÍA

ESTUDIOS SOBRE LA ESTANDARDIZACION DE LAS REACCIONES SEROLOGICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNOSTICO DE LA BRUCELOSIS (*)

por

A. FOZ

INTRODUCCION

La estandarización de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la brucelosis humana o animal representa un caso particular dentro del problema de la estandarización de las reacciones serológicas.

Se trata de encontrar una técnica que nos proporcione resultados que sean reproducibles no sólo en el sentido de calificar la reacción como positiva o negativa, sino también en la expresión "cuantitativa" de los resultados positivos. Por otra parte, es preciso que esta técnica no sea excesivamente complicada y que sea a la vez específica y sensible. Lo que quiere decir que precisamos una técnica que permita diagnosticar serológicamente el mayor número posible de casos de brucelosis y que, al mismo tiempo, permita expresar nuestros resultados con una cifra que debería ser para cada suero la más elevada que se pueda obtener al aplicar *esta* reacción al estudio de *este* suero; y válida igualmente tanto si se aplica al hombre como a las más diversas especies animales.

Vamos a abordar el estudio de algunos puntos de este problema ba-

(*) Comunicación presentada en la Real Academia de Medicina de Barcelona, sesión del 25 de febrero de 1969.

sándonos en nuestra experiencia personal sobre *brucelosis humana*. La exposición que sigue corresponde en su mayor parte al contenido de nuestra ponencia presentada en el XXIV Simposio Internacional de Estandarización Biológica (7).

Son muy numerosos los métodos serológicos utilizados para el diagnóstico de la brucelosis. Los más empleados son la seroaglutinación, la reacción de fijación de complemento y la demostración de anticuerpos no aglutinantes según técnica de Coombs.

Difieren considerablemente los resultados conseguidos hasta ahora en la estandarización de cada una de estas tres pruebas. En el caso de la *seroaglutinación* los avances realizados son considerables; existe un suero estándar internacional anti-*Brucella abortus* aceptado unánimemente y una técnica para la ejecución y lectura de la reacción sencilla y fácil de estandarizar. Más aún, el consejo de la OMS de expresar los resultados de la prueba en *unidades* se va difundiendo poco a poco y cabe esperar que en breve plazo llegue a ser el método más utilizado, sino el exclusivo.

En el caso de la *prueba de Coombs* el problema es más difícil. La mayor dificultad radica en la necesidad de obtener sueros antiglobulina específicos para cada especie en la que deben investigarse los anticuerpos anti-*Brucella* (suero antiglobulina humana, antiglobulina de bóvido, antiglobulina de cabra, etc.) debidamente estandarizados. Hasta el momento actual no se han realizado estudios suficientes para resolver este problema con base segura.

Las dificultades son mayores aún en el caso de la *reacción de fijación de complemento*. No olvidemos que aparte del suero problema, intervienen en la reacción cinco elementos más, y que las diferencias en la preparación de cada uno de ellos, valoración, dosis, proporción en relación con los otros reactivos, etc., pueden ser considerables.

Dichos reactivos son: la solución diluyente, el complemento, los glóbulos de carnero, la hemolisina anticarnero y el antígeno. De ellos, los cuatro últimos son productos biológicos complejos, de difícil estandarización. Como se comprende, las variantes técnicas de la reacción son casi tantas como autores se han ocupado del tema.

La importancia creciente que se da a la reacción de fijación de complemento para el diagnóstico de la brucelosis y las diferencias en las técnicas y en los resultados de los diversos laboratorios, indujo independientemente a dos organizaciones internacionales a abordar el estudio de su estandarización. Por una parte, la Sección Permanente de Estandar-

dización Biológica de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología eligió como tema para su reunión de 1968 "La estandarización y control de vacunas y de reactivos brucelares". Por otra parte, aprovechando la Reunión a la que acabamos de referirnos, algunos miembros del Comité de Expertos en Brucelosis de la OMS, en reuniones no oficiales, precisaron algunos puntos para continuar los trabajos en curso.

La exposición que vamos a hacer corresponde fundamentalmente, como ya hemos dicho, al contenido de nuestra ponencia presentada en la reunión de Túnez a la que nos venimos refiriendo. Aportamos, además, algunos datos conseguidos con posterioridad a dicha reunión y que forman parte de los trabajos en curso de realización.

No es posible abordar el estudio de los múltiples problemas ya resueltos o pendientes de resolver relativos a la estandarización de las reacciones serológicas utilizadas para el diagnóstico de la brucelosis. Nos vamos a ocupar de manera casi exclusiva de la influencia que sobre dichas reacciones ejerce la existencia en las suspensiones bacterianas de brucelas de una fracción antigénica en forma disuelta, es decir, independiente de los cuerpos bacterianos.

Se trata de un hecho que no debemos olvidar al estudiar la estandarización de la seroaglutinación, fijación de complemento y prueba de Coombs; aunque su valor pueda ser diferente en cada una de estas reacciones.

1. ANTIGENO BRUCELAR DISUELTO

a) Presencia en las suspensiones aglutinantes de Brucella de un antígeno disuelto

Habíamos señalado en 1954 (10) y hemos insistido en publicaciones posteriores (6 y 8-9), que las suspensiones de brucelas utilizadas como antígeno para la reacción de seroaglutinación contienen una cantidad más o menos elevada de *antígeno disuelto*, es decir, las suspensiones utilizadas habitualmente para la seroaglutinación son, en realidad, una mezcla de *antígeno corpuscular* (representado por la célula bacteriana) y de *antígeno disuelto*.

Para demostrar la existencia del *antígeno disuelto* se centrifuga la suspensión aglutinante ordinaria a una velocidad de 5.000-10.000 r/m, du-

rante veinte-treinta minutos; se consigue así la sedimentación de las brucelas y la separación de un líquido sobrenadante, transparente e incoloro. Centrifugamos de nuevo este líquido en las mismas condiciones, le separamos del mínimo sedimento que queda después de la segunda centrifugación y centrifugamos de nuevo una tercera y una cuarta vez, para asegurar la eliminación total de las brucelas. Se pueden separar asimismo las brucelas del antígeno disuelto filtrando la suspensión aglutinante ordinaria a través de un filtro Seitz EK.

Con uno u otro método el líquido obtenido es transparente e incoloro y el antígeno que contiene corresponde a lo que llamamos *antígeno disuelto*. Su capacidad antigénica se puede poner de manifiesto *in vivo* e *in vitro*. *In vivo*, basta una inyección intravenosa al conejo de 1 ml del filtrado de una suspensión aglutinante de brucelas para inducir en un plazo de cinco-ocho días títulos aglutinantes anti-*Brucella* del 1/500 y superiores. *In vitro*, se comporta como un antígeno muy sensible para la reacción de fijación de complemento.

Recientemente, en el XXIV Simposio de Estandarización Biológica, celebrado en Túnez en diciembre de 1968, Valette (17) ha confirmado la presencia de este antígeno disuelto y ha señalado su posible importancia en la seroaglutinación, y Colson y colaboradores (4) han estudiado la influencia en la aparición del antígeno disuelto del antiséptico adicionado a la suspensión.

La mayor parte de nuestros trabajos para la demostración de este antígeno disuelto se han realizado con suspensiones obtenidas a partir de la cepa *Brucella abortus* 99. Hemos ensayado asimismo suspensiones obtenidas con las cepas de referencia de las tres especies de *Brucella*: *Br. melitensis* 16 M, *Br. abortus* 544, *Br. suis* 1.330 y con la cepa *B. abortus* B 19; con todas hemos podido demostrar la presencia de antígeno disuelto.

La liberación de antígeno en las suspensiones bacterianas parece ser un fenómeno frecuente, tal vez constante; la hemos podido comprobar en las suspensiones de *Salmonella typhi* (cepa 0 901), de *Proteus* OX 19 (cepa La 2.325) y de *Escherichia coli*.

Nuestros conocimientos sobre la naturaleza de este antígeno brucelar disuelto y las condiciones de su aparición son aún muy fragmentarios.

Hemos podido demostrar que en una suspensión obtenida de cultivos muy recientes (de menos de veinticuatro horas) en medio sólido, existe ya en cantidad muy elevada. Se puede demostrar la presencia

de antígeno disuelto tanto si la suspensión bacteriana se hace en solución salina fisiológica fenolada al 0,5 % (como es habitual), como si se hace en solución salina fisiológica sin adicionar ningún antiséptico. Hemos podido comprobar asimismo que, proporcionalmente, se encuentra en la misma cantidad en las suspensiones bacterianas muy concentradas que en las suspensiones diluidas a la concentración utilizada para la seroaglutinación.

En trabajos en curso hemos podido comprobar la termorresistencia del antígeno disuelto. Una preparación del mismo sometida a la ebullición durante una hora conserva su capacidad antigénica.

b) Influencia del antígeno disuelto en la seroaglutinación y en la prueba de Coombs

No hemos estudiado con detalle la influencia del antígeno disuelto sobre la seroaglutinación; hemos podido comprobar por algunos ensayos

Cuadro 1. Prueba de Coombs aplicada al diagnóstico de la brucelosis humana. Resultados comparativos de la reacción practicada con antígeno corpuscular y con antígeno mixto (corpuscular + disuelto)

Número	Nombre	Título con antígeno corpuscular (C) (suspensión lavada)	Título con antígeno mixto (M) (suspensión no lavada)	Relación C/M
1	D. N.	1/1.280	++	2
2	G. V.	1/1.280	++	2
3	J. N.	1/1.280	+++	2
4	M. P.	1/640	+++	1
5	B. R.	1/2.560	+	2
6	J. V.	1/20.000	+	2
7	M. M.	1/10.000	+	2
8	J.-A. B.	1/2.560	+++	4
9	M. S.	1/1.280	++	2
10	A. O.	1/640	++	2
11	J. P.	1/1.280	++	2
12	J. A.	1/5.120	+++	1
13	S. X.	1/5.120	++	2
14	S. C.	1/640	++	2
15	P. G.	1/10.000	++	2
16	L. A.	1/1.280	++	2
17	D. F.	1/5.120	+++	1
18	L. A.	1/5.120	+++	2
19	E. C.	1/2.560	++	2
20	F. L.	1/640	++	2

previos que el antígeno disuelto no parece ejercer gran influencia sobre los resultados de la prueba. Creemos, sin embargo, que este problema merece un estudio minucioso.

En la *prueba de Coombs* la influencia del antígeno disuelto es evidente. Si empleamos una suspensión corpuscular pura, es decir, desprovista de antígeno disuelto, los títulos obtenidos son, por regla general, el doble de los que se obtienen con la suspensión ordinaria (*cuadro 1*).

En nuestro trabajo de rutina para la prueba de Coombs utilizamos siempre suspensiones de *Brucella* desprovistas de antígeno disuelto. Creemos que al estudiar las condiciones de estandarización de la prueba de Coombs, debe tenerse en cuenta la importancia de este hecho.

2. TECNICA EMPLEADA PARA LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO

No vamos a ocuparnos de los problemas que plantea la estandarización de los otros reactivos que intervienen en la prueba (solución diluyente, complemento, suero hemolítico y hematíes de carnero) ni de los detalles técnicos referentes a la inactivación del suero, condiciones de la incubación, lectura de los resultados, etc. Por lo que se refiere a estos aspectos, hemos empleado la técnica recomendada por Alton y Jones (1), con ligeras variantes.

En el *cuadro 2* esquematizamos el método empleado por nosotros. Señalemos que en nuestros resultados referimos siempre las diluciones del suero a su *dilución final*. Creemos que es muy importante ponerse de acuerdo acerca de la manera de expresar los resultados de la prueba para evitar confusiones y facilitar su comparación. De la misma manera que se hace para la prueba de Coombs y la seroaglutinación, nosotros referimos los resultados a la dilución final del suero, es decir, a la dilución del suero una vez mezclado con el antígeno, con el complemento y con la solución diluyente, caso de que ésta se tenga que añadir.

a) *Solución tampón de barbitol*. Se emplea como disolvente para los reactivos y se prepara según la fórmula de Kabat y Mayer (13).

b) *Suero problema*. Inactivado por calentamiento al baño de María a 56 °C durante treinta minutos.

c) *Complemento*. Suero de cobayo diluido con solución tamponada de barbitol, hasta contener dos unidades hemolíticas completas en 0,3 ml.

Cuadro 2. Esquema de la reacción de fijación de complemento aplicada al diagnóstico de la brucelosis

Número de tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	Control del suero		Control del antígeno	
Suero inactivado y diluido al 1/5 (*)	0,5	0,5	—	—	—	—	—	—		0,5	0,5	—
Solución salina tamponada (*)	—	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5		—	0,5	0,5
Antígeno (8 unidades antigénicas) (*)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2		—	—	0,2
Complemento (2,5 unidades completas) (*)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3		0,3	0,3	0,3
Solución salina tamponada (*)	—	—	—	—	—	—	—	—		0,2	0,2	—
De 18 a 20 horas a la temperatura de 4 °C												
Mezcla hemolítica (*)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1
Incubación al baño de María a 37 °C durante 20 minutos												
Lectura												
Dilución final del suero	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280				

(*) Volúmenes expresados en mililitros.

d) *Mezcla hemolítica*. Se prepara mezclando a partes iguales los dos reactivos: *suero hemolítico* diluido con tampón de barbitol, hasta contener 3 unidades hemolíticas/ml, y *hematíes de carnero* al 6 %, en tampón de barbitol.

e) *Antígeno*. Hemos obtenido el *antígeno corpuscular*, el *antígeno disuelto* y el *antígeno mixto* partiendo de la misma suspensión de brucelas.

Previamente habíamos hecho un estudio comparativo con las cepas *Brucella abortus* B 19, *Br. abortus* 544, *Br. melitensis* 16-M y *Br. suis* 1.330, habiendo obtenido resultados similares con todas. Para el trabajo de rutina así como para los trabajos que aquí se exponen, empleamos suspensiones obtenidas con la cepa *Br. abortus* 99.

Preparamos la suspensión bacteriana partiendo de cultivos de cuarenta y ocho horas en agar-patata y hemos utilizado las dos variantes siguientes:

1.^a Según las normas indicadas por las publicaciones de la OMS, recogidas por Alton y Jones (1) en su monografía. Según estas normas, se suspende el cultivo en solución salina fisiológica estéril, se filtra a través de lana de vidrio, se inactiva la suspensión calentándola al baño de María a 60 °C durante una hora, se la deja enfriar y se la filtra de nuevo a través de algodón. A continuación, se le añade *fenol* hasta una concentración final de 0,5 %. Se conserva la suspensión en la nevera y se la puede utilizar después de una semana.

2.^a Con la otra variante, los cultivos de cuarenta y ocho horas se suspenden directamente en solución salina fisiológica *fenolada* al 0,5 %; la suspensión así obtenida se filtra a través de una fina capa de algodón y se mantiene en la estufa a 37 °C durante dos-tres días. Después de dos controles sucesivos de esterilidad se la puede estandarizar y utilizar.

Para nuestros primeros trabajos utilizamos esta segunda variante. El hecho de que la suspensión bacteriana se mantuviera cuarenta y ocho horas a 37 °C en presencia de fenol, nos sugirió la idea de que la aparición del *antígeno disuelto* podía ocurrir en este momento. Un estudio comparativo de las suspensiones obtenidas con las dos variantes nos ha demostrado que la cantidad de antígeno disuelto es más o menos la misma en los dos casos.

En la actualidad preparamos el antígeno según la variante primera.

3. PREPARACION DE LOS ANTIGENOS PARA LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Partimos del mismo antígeno utilizado para la seroaglutinación y estandarizamos cada lote con un suero estandar provisional comparado con el internacional ya citado. Siempre que nos es posible trabajamos con una concentración bacteriana tal que nos permita obtener una aglutinación positiva ++ (aglutinación al 50 %) con el suero estandar diluido al 1/500. Como ya hemos indicado, para la reacción de fijación de complemento empleamos este mismo antígeno, a partir del cual obtenemos los tres tipos de antígeno que vamos a estudiar.

a) Preparación del antígeno corpuscular puro

Obtenemos el *antígeno corpuscular puro* lavando 4 veces la suspensión estandar aglutinante de brucelas, por centrifugación, con solución salina tamponada. En nuestros primeros ensayos utilizábamos una centrífuga Wifug a la velocidad de 8.000-10.000 r/m. En la actualidad, empleamos una centrífuga Christ, modelo Piccolo, a la velocidad de 4.000-5.000 r/m.

Después de la última centrifugación resuspendemos el sedimento bacteriano hasta su volumen inicial con solución salina fenolada al 0,5 %. El antígeno así preparado debe utilizarse el mismo día de su preparación. Si queremos utilizarlo al día siguiente, lo lavamos una última vez inmediatamente antes de su empleo.

b) Preparación del antígeno disuelto

Partimos de la misma suspensión aglutinante brucelar estandarizada. Eliminamos los gérmenes por centrifugación repitiendo tres veces más la centrifugación del líquido sobrenadante para asegurar la ausencia de cuerpos bacterianos. Se obtienen resultados análogos si se filtra la suspensión a través de un filtro Seitz EK. El antígeno así preparado se conserva durante mucho tiempo.

c) Preparación del antígeno mixto

Llamamos antígeno mixto a la suspensión aglutinante brucelar ordinaria, ya que ella contiene antígeno corpuscular y antígeno disuelto. Empleamos como antígeno mixto la suspensión aglutinante estandarizada.

4. ESTANDARIZACION DEL ANTIGENO PARA LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Para la titulación del antígeno hemos empleado la técnica llamada del "damero" (véanse *cuadros 3-5*). Existen diversas variantes de esta técnica; nosotros utilizamos la de Alton y Jones (1), autores que definen la *unidad antigénica* como "la cantidad de antígeno contenida en la mayor dilución que dé al menos un 50 % de fijación con el suero utilizado como patrón, sea cual sea la dilución de este último. Cuando se emplea esta técnica es recomendable usar para la prueba de rutina 8 unidades antigénicas". De acuerdo con la recomendación de Alton y Jones para la reacción utilizamos 8 unidades antigénicas.

No hay unanimidad en lo que se refiere al valor de la unidad antigénica, ni tampoco al número de unidades que deben utilizarse para la reacción; así por ejemplo, Bürki (3) utiliza una técnica de valoración del antígeno igual a la de Alton y Jones (1) y a la nuestra, pero para la práctica de la reacción emplea 4 unidades; Renoux (15), con unidades de valor diferente (mayores), recomienda 2, etc. En las normas establecidas por el Ministerio de Sanidad norteamericano (14) no se acepta el concepto de unidad antigénica y se recomienda el empleo de la "dilución óptima" del antígeno.

El primer punto a estudiar es qué suero anti-*Brucella* debe emplearse para la titulación del antígeno. En tanto no se haya precisado este punto no será posible obtener resultados reproducibles con exactitud, puesto que aún trabajando con sueros del mismo título los resultados de la titulación pueden variar ampliamente.

Según Alton y Jones (1) se debe utilizar "un suero liofilizado de título medianamente elevado". Según Renoux (15) "el título final del suero o sueros positivos utilizados no es de importancia decisiva para la titulación del antígeno, siempre que estos títulos sean iguales o superiores a 1/256" (este título equivale a 1/768, según nuestra notación). Bürki (3) y Ulbricht y Scheibner (16) han recomendado el empleo del mismo suero estándar que para la seroaglutinación y han estudiado el I Suero Estándar Internacional anti-*Brucella abortus*. Nosotros utilizamos provisionalmente el valor medio de los datos obtenidos utilizando la técnica del damero con dos sueros anti-*Brucella* humanos con título del 1/1.280.

Cuadro 3. Valoración según técnica del "damero" de un antígeno mixto (corpúscular + disuelto) de Br. abortus con el suero de un enfermo de brucelosis

Diluciones del antígeno	Diluciones del suero								
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560
1/4	O	O	O	O	O	O	O	H	H
1/8	O	O	O	O	O	O	O	H	H
1/12	O	O	O	O	O	O	O	H'	H
1/16	O	O	O	O	O	O	O	H'	H
1/20	O	O	O	O	O	O	O	H	H
1/24	O'	O	O	O	O	O	O	H	H
1/32	±	O'	O	O	O	O	O	H	H
1/40	H	H	O'	O	O	O	O	H	H
1/48	H	H	O'	O	O	O	O	H	H
1/56	H	H	±	O	O	O	O'	H	H
1/64	H	H	H'	O	O	O'	H'	H	H
1/72	H	H	H	±	O'	±	H	H	H
1/80	H	H	H	H	H	H	H	H	H

H = Hemólisis completa; H' = Hemólisis casi completa; ± = Hemólisis 50 %;
O' = Indicios de hemólisis; O = No hemólisis

Cuadro 4. Valoración según técnica del "damero" de un antígeno corpúscular de Br. abortus con el suero de un enfermo de brucelosis

Diluciones del antígeno	Diluciones del suero								
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1.280	1/2.560
1/4	O	O	O	O	O	O	O	H	H
1/8	±	O	O	O	O	O	O	H'	H
1/12	H	±	O	O	O	O	O	H'	H
1/16	H	H	O'	O	O	O	O	H'	H
1/20	H	H	±	O	O	O	O	H'	H
1/24	H	H	H	O	O'	O'	O'	H'	H
1/32	H	H	H	±	O'	H'	H	H	H
1/40	H	H	H	H	H	H	H	H	H
1/48	H	H	H	H	H	H	H	H	H

H = Hemólisis completa; H' = Hemólisis casi completa; ± = Hemólisis 50 %;
O' = Indicios de hemólisis; O = No hemólisis

Cuadro 5. Valoración según técnica del "damero" de un antígeno disuelto de Br. abortus con el suero de un enfermo de brucelosis

Diluciones del antígeno	Diluciones del suero						
	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640
1/2	O	O	O	O	O	H	H
1/4	O	O	O	O	O	H	H
1/8	O	O	O	O	O	O	H
1/12	O	O	O	O	O	O	H
1/16	O'	O	O	O	O	O	H
1/20	H	H	O'	O	O	O	H
1/24	H	H	O'	O	O	O	H
1/32	H	H	H'	O'	O	±	H
1/36	H	H	H	±	O'	H'	H
1/40	H	H	H	H	±	H	H

H = Hemólisis completa; H' = Hemólisis casi completa; ± = Hemólisis 50 %; O' = Indicios de hemólisis; O = No hemólisis

El problema se hace aún más complejo si aplicamos la técnica del damero y el cálculo del valor de la unidad antigénica a la estandarización del antígeno corpuscular, del antígeno disuelto y del antígeno mixto.

Copiamos los resultados de uno de nuestros ensayos de estandarización triple realizados con el mismo suero (*cuadros 3-5*).

Con el ejemplo que presentamos, para trabajar con 8 unidades antigénicas deberíamos utilizar el antígeno corpuscular diluido al 1/4, el antígeno mixto al 1/9 y el antígeno disuelto al 1/5. Como veremos luego, si empleamos estas concentraciones los títulos de un suero determinado difieren casi siempre, en ocasiones muy ampliamente, con cada uno de los antígenos.

Si empleamos para la valoración otro suero (u otros sueros) con el mismo título del ejemplo anterior (1/640) o con títulos ligeramente superiores o inferiores (1/1.280 y 1/320), los resultados difieren considerablemente y si queremos utilizar 8 unidades antigénicas, las diluciones a emplear variarán, según diferentes ensayos, para el antígeno corpuscular entre el 1/2 y el 1/4, para el antígeno mixto entre 1/3,5 y el 1/11 y para el antígeno disuelto entre el 1/2 y el 1/10.

5. RESULTADOS DE LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO PRACTICADA CON LOS TRES TIPOS DE ANTIGENO ESTANDARDIZADOS

En las condiciones que acabamos de exponer, y tal como ya hemos indicado, los resultados de la reacción de fijación de complemento son muy diferentes según la naturaleza del antígeno utilizado. Hemos estudiado una serie de sueros humanos de enfermos de brucelosis (*Brucella melitensis*) empleando antígeno corpuscular, antígeno mixto y antígeno disuelto, con 8 unidades antigénicas de cada uno de ellos, estandarizados los tres según el esquema anterior. Exponemos los resultados en el cuadro 6.

Cuadro 6. Reacción de fijación de complemento aplicada al diagnóstico de la brucelosis humana. Título de la reacción de fijación de complemento con antígeno corpuscular, antígeno mixto (corpuscular + disuelto) y antígeno disuelto

Número	Nombre	Antígeno corpuscular	Antígeno mixto	Antígeno disuelto
I. S. Ab. S. (*)		1/2.560	1/1.280	1/320 (± 1/640)
1	J. S.	1/320	1/320	1/320
2	B. M.	1/1.280	1/640	1/640
3	F. S.	1/1.280	1/320	1/160
4	J. C.	1/320	1/160	1/80
5	M. M.	1/1.280	1/1.280	1/160
6	M. S.	1/160	1/80	1/20 (± 1/40)
7	J. P.	1/640	1/320	1/160
8	M. G. (**)	neg.	neg.	neg.
9	L. O.	1/640 (± 1/1.280)	1/640	1/160
10	J. B.	1/640	1/320	1/160
11	A. G.	1/2.560	1/1.280	1/320
12	M. P.	1/640	1/320	1/20
13	A. G.	1/320	1/160 (± 1/320)	1/80
14	B. A.	1/1.280	1/1.280	1/320
15	M. S.	1/160	1/80	1/40
16	J.-J. R.	1/640	1/320	1/80
17	R. A.	1/1.280	1/640	1/160
18	P. C.	1/640	1/320	1/160
19	D. F.	1/1.280	1/1.280	1/320 (± 1/640)
20	E. C.	1/320	1/160	1/80

(*) I Suero Estandar Internacional anti-*Br. abortus*.

(**) Seroaglut. *Br.* = 142 U/ml; Coombs, *Br.* = + 1/640.

Con todos los sueros, el título más elevado se obtiene con el antígeno corpuscular y el título más bajo con el antígeno disuelto. Sólo en cuatro ocasiones se ha obtenido el mismo título con el antígeno corpuscular y el mixto, y sólo una vez el título con el antígeno disuelto ha sido tan elevado como con los otros dos antígenos.

Con el suero estandar internacional el título más elevado corresponde también al antígeno corpuscular y el más bajo al antígeno disuelto; con el antígeno mixto, el título es intermedio.

Ignoramos si la dosis óptima es la misma para cada antígeno o si, por el contrario, es diferente. En caso de ser diferente sería muy interesante averiguar si empleando las unidades antigénicas óptimas para cada antígeno, se obtenía el mismo título con los tres antígenos.

6. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DEL ANTIGENO SOBRE EL TITULO DE LA REACCION DE FIJACION DE COMPLEMENTO

Es un hecho conocido que la relación entre la cantidad (y calidad) de los anticuerpos y la cantidad de antígeno juega un importante papel en el título de la reacción; esta es la razón por la que la concentración de antígeno con la que se obtiene el título más elevado, puede variar de manera considerable de un suero a otro.

Hemos estudiado este punto con un grupo de 15 sueros empleando como antígeno la suspensión aglutinante ordinaria (antígeno corpuscular + antígeno disuelto) y hemos podido observar que el *título máximo* se obtiene con una dosis de antígeno que oscila entre 24 y 3 unidades antigénicas, aproximadamente (*cuadro 7*).

Con 8 unidades antigénicas (dilución del antígeno al 1/7,5) se obtiene el título máximo sólo en 5 de los 15 sueros estudiados.

A pesar de que los resultados del cuadro han sido obtenidos con una técnica diferente de la que empleamos actualmente (han sido publicados en 1953) (5) los creemos tan demostrativos que nos atrevemos a reproducirlos aquí. Posteriormente, Hadju (11-12) y Bürki (2-3), en investigaciones muy detalladas, los han confirmado y ampliado.

Cuadro 7. Reacción de fijación de complemento aplicada al diagnóstico de la brucelosis humana. Influencia de la concentración del antígeno sobre el título de la reacción

Núm.	Nombre	Dilución del antígeno							
		1/2,5	1/5	1/7,5	1/10	1/12,5	1/15	1/17,5	1/20
1	J. P.	1/40	1/50	1/50	1/50	1/50	1/50	1/40	1/40
2	S. R.	1/240	1/240	1/140	1/80	1/60	1/50	1/25	neg.
3	S. R.	1/320	1/480	1/640	1/640	1/640	1/560	1/560	1/560
4	J. G.	1/70	1/60	1/35	1/35	1/25	1/25	1/15	neg.
5	M. G.	1/80	1/80	1/80	1/120	1/120	1/140	1/120	1/120
6	M.	1/80	1/80	1/20	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
7	M. Q.	1/1.120	1/1.120	1/1.120	1/1.120	1/1.120	1/1.600	1/1.920	1/1.600
8	S. P.	1/60	1/70	1/80	1/80	1/80	1/80	1/70	1/70
9	M.	1/30	1/20	1/20	1/20	1/17,5	1/10	neg.	neg.
10	L. H.	1/100	1/100	1/120	1/120	1/120	1/100	1/80	1/80
11	R. A.	1/140	1/80	1/25	1/17,5	1/10	1/10	neg.	neg.
12	P. L.	1/60	1/70	1/80	1/80	1/60	1/60	1/50	1/40
13	R.	1/560	1/480	1/320	1/160	1/160	1/80	1/17,5	neg.
14	S.	1/80	1/80	1/70	1/50	1/40	1/40	1/35	1/30
15	J.-L. D.	1/50	1/25	1/10	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

CONCLUSIONES

La estandarización del antígeno para la reacción de fijación de complemento plantea muchos y muy complejos problemas. Hemos señalado, de preferencia, el papel que juega en la reacción el "antígeno disuelto" presente en las suspensiones bacterianas utilizadas habitualmente como antígeno; creemos que si se utilizan como antígeno suspensiones bacterianas, no debe olvidarse el diferente comportamiento de los "antígenos corpusculares puros" (suspensiones bacterianas lavadas) y de los que nosotros llamamos "antígenos mixtos" (mezcla de antígeno corpuscular y antígeno disuelto) representados por las suspensiones aglutinantes ordinarias.

Este hecho y el ya conocido de la considerable influencia de la concentración del antígeno sobre el título de la reacción —tan considerable que para obtener el título máximo la concentración del antígeno puede ser hasta 8 veces más elevada de un suero a otro— hace muy difícil, sino imposible, encontrar un antígeno que a una concentración determinada reúna las características de ser específico, ser muy sensible, y ser capaz de dar con cada suero el título más elevado que dicho suero pueda dar con esta reacción.

Es muy difícil determinar si este antígeno ideal debe ser corpuscular, disuelto o mixto. El estudio de este punto y el ensayo del suero estándar internacional anti-*Brucella abortus* como posible suero de referencia para esta reacción, son dos tareas importantes y urgentes a realizar, todo ello aplicado al diagnóstico de la brucelosis humana y animal. Creemos que estos ensayos deben realizarse de acuerdo y con el apoyo de la OMS.

RESUMEN

Las suspensiones bacterianas utilizadas como antígeno para la reacción de aglutinación aplicada al diagnóstico de la brucelosis, contienen habitualmente una cantidad más o menos grande de un *antígeno brucelar disuelto*. Este *antígeno disuelto* cuya existencia fue señalada por nosotros en 1954, influye en la aglutinación, en la fijación de complemento y en la demostración de anticuerpos no aglutinantes anti-*Brucella* según técnica de Coombs.

El antígeno brucelar disuelto se encuentra ya en las suspensiones de *Brucella* recién preparadas, incluso en las preparadas sin adición de ningún antiséptico. Resiste la ebullición durante una hora.

También hemos demostrado, de manera similar, la existencia de un antígeno disuelto en suspensiones de *Salmonella typhi* y de *Proteux* OX 19 y *Escherichia coli*. Cabe pensar que la presencia de este antígeno en las suspensiones bacterianas de los bacilos gram-negativos es un fenómeno muy frecuente sino constante.

Para la reacción de fijación de complemento nosotros hemos utilizado los tres tipos de antígeno siguientes: a) una suspensión corpuscular pura (suspensión aglutinante lavada para eliminar el antígeno disuelto); b) un antígeno brucelar disuelto (el separado por centrifugación o filtra-

ción de la suspensión aglutinante ordinaria; y c) un antígeno mixto (la suspensión aglutinante ordinaria que, como hemos dicho, es una mezcla de antígeno corpuscular y disuelto).

Si se valora cada uno de estos antígenos mediante la técnica del "damero", se obtienen resultados diferentes con cada uno de los tres. Este hecho, unido a la influencia considerable sobre el título de la reacción, de la relación entre cantidad (y calidad) de los anticuerpos y cantidad de antígeno, hace que la estandarización del antígeno para la reacción de fijación de complemento presente considerables dificultades si queremos conseguir una reacción que además de ser específica y sensible nos descubra siempre el título más elevado que se puede encontrar con cada suero.

Es necesario continuar los trabajos en este sentido.

SUMMARY

The bacterial suspension used as antigen for the agglutination test applied to the diagnosis of brucellosis usually contains a more or less large amount of a *soluble brucellar antigen*. This soluble antigen whose presence was pointed out by us in 1954, influences the agglutination test, the complement fixation test and the Coombs test for the demonstration of the nonagglutinating anti-*Brucella* antibodies.

This soluble brucellar antigen is now found in the recently prepared suspensions of *Brucella* even in the suspension prepared without the addition of any antiseptic. It stands boiling for an hour.

We have also demonstrated in the same way the existence of a soluble antigen in suspensions of *Salmonella typhi*, *Proteus* OX 19 and *Escherichia coli*. As it seems the presence of this antigen in the bacterial suspensions of the most diverse gram-negative bacilli is a very frequent if not constant phenomenon.

For the fixation complement test applied to the diagnosis of brucellosis we have used the following three types of antigen: a) a *pure corpuscular suspension* (an antigen for the agglutination test washed to eliminate the soluble antigen); b) a *brucellar soluble antigen* (separated through centrifugation or filtration of the ordinary agglutinating antigen); and c) a *mixed*

antigen (the ordinary agglutinating antigen that, as we have said, is a mixture of corpuscular and soluble antigen).

If the titration of each one of these antigens is carried out as a "chessboard titration" different results are obtained with each one of the three. This fact together with the considerable influence upon the reaction titre of the relation between quantity (and quality) of the antibodies and quantity of antigen, makes very difficult the standardization of the antigen for the complement fixation test if we want to achieve a technique which besides being specific and sensitive, always gives us the highest titre which can be found with each serum.

It is necessary to continue the work on this subject.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTON, G. G., y JONES, L. M. 1968. La Brucellose. Techniques de Laboratoire. Organisation Mondiale de la Santé, Ginebra.
2. BÜRKL, F. 1957. Zentralbl. Veterinaermed., 4, 883.
3. BÜRKL, F. 1961. Standardisierung der Komplementbindungsreaktion auf Brucellose. Zentralbl. Bakteriolog. Parasitenk. Infektionskr. Hyg., 183, 225-45.
4. COLSON, X.; RENOUX, G., y PRUNET, P. 1970. Conservation des antigènes pour sero-agglutination des brucelloses. Symp. Ser. Immunobiol. Stand., 12, 311-14.
5. FOZ, A. 1953. Valor de la reacción de fijación de complemento en el diagnóstico de la brucelosis humana. Ponencia "Brucelosis", 173-90. III Congr. Int. Hig. Med. Mediterráneas, Barcelona.
6. FOZ, A. 1969. Técnica para la demostración de anticuerpos "incompletos" anti-*Brucella* (prueba de Coombs). Rev. Diag. Biol., 12, 208-17.
7. FOZ, A. 1970. Etudes sur la standardisation de l'antigène pour la réaction de fixation du complément appliquée au diagnostic des brucelloses. Symp. Ser. Immunobiol. Stand., 12, 361-72.
8. FOZ, A., y ARCALÍS, L. 1961. Valor de los métodos de laboratorio para el diagnóstico de la brucelosis humana. Rev. Inform. Med. Terap., 36, 451-75.
9. FOZ, A.; ARCALÍS, L.; GARRIGA, S.; MANZANARES, J. M.^a, y ORTIZ-PEÑIL, F. 1954. Valor de algunos métodos de laboratorio en el diagnóstico de la brucelosis humana. Rev. Diag. Biol., 3/5, 349-83.
10. FOZ, A., y GARRIGA, S. 1954. Relation entre la fixation du complément et les "anticorps incomplets" (test de Coombs) dans la brucellose humaine. Rev. Immunol., 18, 288-98.
11. HADJU, S. 1956. Ref.: BÜRKL (3).
12. HADJU, S. 1957. Ref.: BÜRKL (3).
13. KABAT, E. A., y MAYER, M. M. 1961. Experimental Immunochemistry. Thomas Springfield, Ill.

14. Laboratory Branch Task Force. 1965. Laboratory Branch Complement Fixation Method, 1-30. *En* Standardized Diagnostic Complement Fixation Method and Adaptation to Micro Test. Public Health Monograph, núm. 74, Washington.
15. RENOUX, G. 1964. Etalonnage des antigènes pour le diagnostic biologique de la brucellose. *Progress in Immunobiological Standardization*, 1, 176-84. Karger, Basilea-Nueva York.
16. ULBRICHT, F., y SCHEIBNER, E. 1964. Standardization of the brucellosis complement fixation test. *Progress in Immunobiological Standardization*, 1, 196-200. Karger, Basilea-Nueva York.
17. VALETTE, L. 1970. Les antigènes brucelliques pour agglutination. *Symp. Ser. Immunobiol. Stand.*, 12, 299-306.

Nota

Desde febrero de 1969, fecha en que se presentó este trabajo en la Real Academia de Medicina de Barcelona, hasta el momento actual, hemos avanzado considerablemente en el estudio del problema que planteamos. En una publicación posterior llegamos a conclusiones mucho más precisas y firmes. Consecuencia de ello hemos modificado ligeramente la técnica de la reacción. Véase:

- Foz, A. 1970. Estudios sobre la estandarización del antígeno utilizado en las reacciones serológicas para el diagnóstico de la brucelosis. Resumen de la Tesis presentada para aspirar al Grado de Doctor en Medicina. Universidad de Barcelona, Secretariado de Publicaciones, Barcelona.

ULTRAESTRUCTURA Y COMPOSICION QUIMICA DE LAS PAREDES CELULARES DEL *MICROCOCCUS* *MORRHUAE*, HALOFILO OBLIGADO

por

M. SANTAOLALLA y M. RODRÍGUEZ-REBOLLO

INTRODUCCION

Así como diversos investigadores han estudiado la composición química y estructura de las paredes de formas bacilares de microorganismos halófilos (género *Halobacterium*) (1-3, 8-9, 11-12, 14 y 28-29), las cuales presentan gran sensibilidad a la ruptura mecánica, se lisan rápidamente al disminuir la concentración de cloruro sódico y carecen, según los estudios de Kushner y Onishi (13) del mucopéptido normal, constituyente básico de la pared celular de las bacterias del orden Eubacteriales, no conocemos ninguna publicación referente a los halococos extremos (géneros *Micrococcus* y *Sarcina*). Smithies y colaboradores (27), en el año 1955, estudiaron la composición química de la célula y sus paredes en diferentes microorganismos halófilos, no extremos, entre ellos uno de forma esférica, denominado *Micrococcus halodenitrificans*; y recientemente, Schleifer y Kandler (25) estudian la secuencia de los aminoácidos del mucopéptido de diversas especies de cocos moderadamente halófilos.

Los halococos se diferencian plenamente de los halobacilos, entre otros factores, por su resistencia a la lisis y ruptura mecánica. El *Micrococcus morrhuae*, en unión de otros halófilos, produce la alteración denominada "rojo del bacalao", de notable importancia económica, contra la que se carece de medios adecuados de lucha: los lavados con agua

dulce, empleados para eliminar la coloración rojiza de las superficies del pescado alterado, pueden ser efectivos sólo cuando es originada por halobacilos, que se lisan, pero son ineficaces frente a los halococos, que presentan gran resistencia a la lisis por dilución.

Precisamente, la resistencia del género *Micrococcus* a la lisis y ruptura mecánica, diferente a la del género *Halobacterium*, de una parte, y de otra, el hecho de que no se conozcan la estructura y composición química de las paredes celulares de los halococos, nos indujeron a realizar la presente investigación, ya que las cubiertas externas bacterianas pudieran justificar el opuesto comportamiento de ambos grupos de halófilos frente a diversos solutos. El estudio químico se completa con el de la acción de antibióticos, que ejercen su actividad sobre las paredes celulares generalmente.

MATERIAL Y METODOS

Se emplea *Micrococcus morrhuae* Delf, amablemente suministrado por el Dr. Gibbons, del National Research Council, de Canadá. El microorganismo se cultivó en medio líquido de Sehgal y Gibbons (24), en la forma descrita por Onishi y colaboradores (16). El medio se ajustó a pH = 6,2, con NaOH N, esterilizándose a 110 °C, durante quince minutos. El precipitado formado se elimina por filtración a través de un filtro EKA, conforme expusimos uno de nosotros (19).

Los cultivos del microorganismo, con destino a la obtención de paredes celulares, tuvieron lugar en matraces de 6 l de capacidad, con 1,5 l del medio de Sehgal y Gibbons, de 4,3 M de ClNa, en agitación mecánica durante diez días. La temperatura de crecimiento fue de 28 °C. Los halococos se separan por centrifugación y se lavan tres veces con agua destilada estéril. Las correspondientes paredes celulares se obtienen con la técnica que se expresa más adelante.

La curva de crecimiento de *Micrococcus morrhuae*, los ensayos sobre su comportamiento en diversas soluciones de ClNa y agua destilada, y el crecimiento en presencia de antibióticos, se realizaron cultivando el microorganismo en matraces conteniendo 10 ml de medio, en dos series de 2,5 y 4,3 M de ClNa, sembrados con 0,1 ml de suspensión del microorganismo en solución de ClNa al 15 %, densidad óptica de 0,50 a 600 m μ . Los cultivos fueron estacionarios a 37 °C.

Los antibióticos fueron proporcionados por Laboratorios Capitol, S. A. Madrid (cicloserina Kabi) y Antibióticos, S. A. Madrid (penicilina G sódica) (*). Las diluciones se hicieron en agua destilada estéril; las concentraciones de cicloserina variaron entre 0,2 y 10 mg/ml de medio de cultivo y la penicilina entre 500 y 5.000 UI/ml de medio.

Los efectos de ambos antibióticos sobre el crecimiento se estimaron midiendo la densidad óptica a 600 m μ , en Spectronic 20, de Bausch y Lomb, usando un medio no sembrado como blanco. Los resultados se confirmaron por microscopía.

La tinción negativa de los microorganismos se practicó por el método general con ácido fosfotúngstico.

La fijación y proceso de inclusión se realizó en la forma siguiente: las células separadas por centrifugación y lavadas con agua destilada, se fijaron con tetraóxido de osmio al 2 %, en tampón de acetato de veronal, a pH = 7,2, durante dos horas, a 4 °C. Se centrifugaron hasta conseguir un sedimento compacto, se elimina el líquido de la fijación y se añade al sedimento unas gotas de agar fundido, para formar, al enfriarse, un bloque con las células. Este bloque se corta en trozos de 1 mm³, se deshidratan por pases sucesivos en acetona a concentraciones crecientes y se incluyen finalmente en durcupan, que se endurece durante vinticuatro horas en estufa, a 55 °C. Los cortes se tiñen con citrato de plomo.

En la fijación con permanganato potásico se seguía un método análogo, pero se sustituía la solución de tetraóxido de osmio por una solución acuosa al 2 % de permanganato potásico y la fijación se efectuaba a la temperatura ambiente.

Los cortes se realizaron en un ultramicrotomo LKB, y se tiñeron con citrato de plomo.

Las microfotografías electrónicas se realizaron con el microscopio Siemens Elmiskop I, del Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC).

Extracción y análisis de los lípidos

Los lípidos se extraen con una mezcla de cloroformo-metanol (2:1, v/v), a temperatura ambiente, en una proporción de 1/20, dos veces consecutivas.

(*) Los autores muestran su agradecimiento a ambos laboratorios por la cesión de las muestras.

La grasa obtenida se purifica disolviéndola en cloroformo y solución salina al 0,8 %, filtrándose la capa clorofórmica, que se pesa, después de eliminar el disolvente.

Se analiza la grasa por cromatografía en capa fina, según el método de Kelley (10) y los fosfolípidos también por cromatografía de capa fina, conforme al proceder de Skipski y colaboradores (26).

Obtención de las paredes celulares

Se emplean los métodos de Cummins y Harris (4) y Salton y Horne (21), seguidos en anteriores estudios de paredes por uno de nosotros (22-23). En esta ocasión, las células fueron desintegradas en el aparato de Braun, previo calentamiento en estufa a 60 °C con lauril-sulfato sódico. Las paredes, una vez comprobada su pureza por microscopía normal y electrónica, fueron lavados con agua, alcohol-agua, alcohol y finalmente, tras la adición de acetona, se secan hasta peso constante.

Con las paredes suspendidas en agua a la concentración de 1 mg/ml, aproximadamente, se hizo una curva de absorción en el ultravioleta.

Hidrólisis y análisis cromatográfico

a) Precipitación de la sustancia proteica e hidrólisis posterior. Se añade a una parte de las paredes secas, ácido tricloroacético al 5 %, para precipitar la proteína de la pared; se mantiene el precipitado doce horas en frigorífico y se separa por centrifugación. Sucesivamente, se lava con agua, alcohol, alcohol-éter y éter y posteriormente se deseca en estufa a 50 °C hasta peso constante.

La identificación de los aminoácidos se verifica sobre 0,01 g de precipitado hidrolizado con ClH 6N, a 115 °C, durante dieciséis horas. Se evapora el líquido a sequedad en estufa, a unos 50 °C, evaporándose el residuo, previamente disuelto en agua destilada, en desecador al vacío con SO_4H_2 y KOH en forma de perlas, para eliminar las trazas de ClH. Finalmente, el residuo se disuelve en agua para efectuar el análisis cromatográfico.

b) Determinación cromatográfica de los aminoácidos. Papel, Whatman, núm. 1. Disolvente: butanol-n, 40; etanol, 10; ácido acético, 10, y agua, 20. Revelador, ninhidrina.

c) Hidrólisis del componente glucídico. Se hicieron dos clases de

hidrólisis de las paredes para investigar los monosacáridos, ambas en tubo cerrado: una, con SO_4H_2 2N a 100 °C, durante dos horas, neutralizando el exceso de ácido con $\text{Ba}(\text{OH})_2$, separando el precipitado de sulfato por centrifugación, evaporando el líquido a baja temperatura y disolviendo el residuo en pequeña cantidad de agua destilada. La otra hidrólisis se realizó con ClH 4N, durante cuatro horas a 100 °C, eliminando el exceso de ácido, como se indica anteriormente al tratar de la hidrólisis de la sustancia proteica. Esta hidrólisis se emplea fundamentalmente para identificación de hexosaminas.

d) Determinación cromatográfica de los monosacáridos. Se emplea la cromatografía sobre papel Whatman, núm. 1. Disolvente: butanol-n, 40; ácido acético, 10; agua hasta saturación (capa superior). Como reveladores, para azúcares reductores, se emplea el nitrato de plata, según Trevelyan y colaboradores (31) y el ftalato de anilina; para aminoazúcares, el reactivo de Elson y Morgan (6), y para acetilaminoazúcares, el de Salton (20).

Se investigan y comprueban distintos monosacáridos por cromatografía sobre capa fina de silicagel G, según el método de Gal (7).

RESULTADOS

Las experiencias sobre el crecimiento demuestran que *Micrococcus morrhuae* crece en el medio mencionado de Sehgal y Gibbons cuando las concentraciones de ClNa están comprendidos entre 2,5 y 4,3 M.

Las células del halococo, mantenidas en agua destilada y en soluciones de ClNa de 0,8 a 4,3 M, durante períodos de quince días, muestran, al ser observadas por microscopía de contraste de fase, que conservan su integridad, en contraposición a lo que ocurre con los halobacilos extremos (19).

Tanto en el medio con 2,5 M como 4,3 M de ClNa , la penicilina no inhibía el crecimiento del *Micrococcus morrhuae* a las dosis ensayadas (500-5.000 UI/ml), en tanto que la cicloserina efectuaba la inhibición a una concentración de 0,8 mg/ml de medio de cultivo.

Ultraestructura

Las microfotografías electrónicas, obtenidas a partir de tinciones negativas, muestran la forma clásica de agrupamiento, en que crecen estos

microorganismos (*figura 1*) (tetradas, en general). En los cortes ultrafinos, obtenidos por tinción con permanganato (*figura 3*), se observa una "unidad de membrana", que engloba varias bacterias y también separa cada una de ellas; a continuación, un espacio entre esta unidad de membrana externa y el citoplasma, que no se tiñe con el permanganato; después de este espacio interior, aparece el citoplasma con el nucleóide (*figura 3*).

En los cortes ultrafinos, teñidos con osmio, se observa una pared celular, posiblemente formada por una unidad de membrana externa, seguida de un espacio de grosor variable que se tiñe intensamente por el osmio y un límite bien definido; pero no se aprecia unidad de membrana, que separe este espacio del citoplasma, en el cual también aparece el nucleóide (*figuras 4-7*).

Análisis químico

Las paredes celulares en suspensión acuosa al 1 ‰ dieron la curva de máxima absorción que se recoge en la *figura 8*.

De 8,30 g de microorganismos secos, que fueron tratados con la mezcla cloroformo-metanol, según se exponen anteriormente, se extrae una lipoproteína, cuyo peso, una vez seco, fue de 0,0975 g, equivalente al 1,17 % del peso seco de partida. Separada la parte lipídica de esta lipoproteína, se obtiene, después de seca, un peso de 0,0125 g, que equivalen al 12,82 % respecto a la lipoproteína seca y al 0,15 % en relación con el microorganismo desecado.

En la sustancia grasa, sólida a la temperatura ordinaria, y blanco-amarillenta, se caracterizan ácidos grasos libres y triglicéridos, siguiendo el método de Kelley (10). Se pretende identificar fosfolípidos por el método de Skipski (26), previo intento de disolución en éter sulfúrico (sólo se disolvió en parte) y precipitación con acetona (no se formó precipitado), con resultados negativos. Se identificó un pigmento de tipo carotinoide.

En la porción proteica de la lipoproteína, se identifican distintos aminoácidos, entre ellos ácido diaminopimélico. En el mucopéptido de la pared celular, después de hidrolizado, se encuentran cuatro aminoácidos: ácido diaminopimélico, ácido aspártico, ácido glutámico y lisina; la mayor proporción corresponde a ácido aspártico (al menos, doble cantidad que la correspondiente a cualquiera de los otros aminoácidos).



Figura 1. Microfotografía electrónica de M. morrhuae. Tinción negativa. $\times 26.000$



Figura 2. Microfotografía electrónica de las paredes celulares de M. morrhuae. Tinción negativa. $\times 46.000$

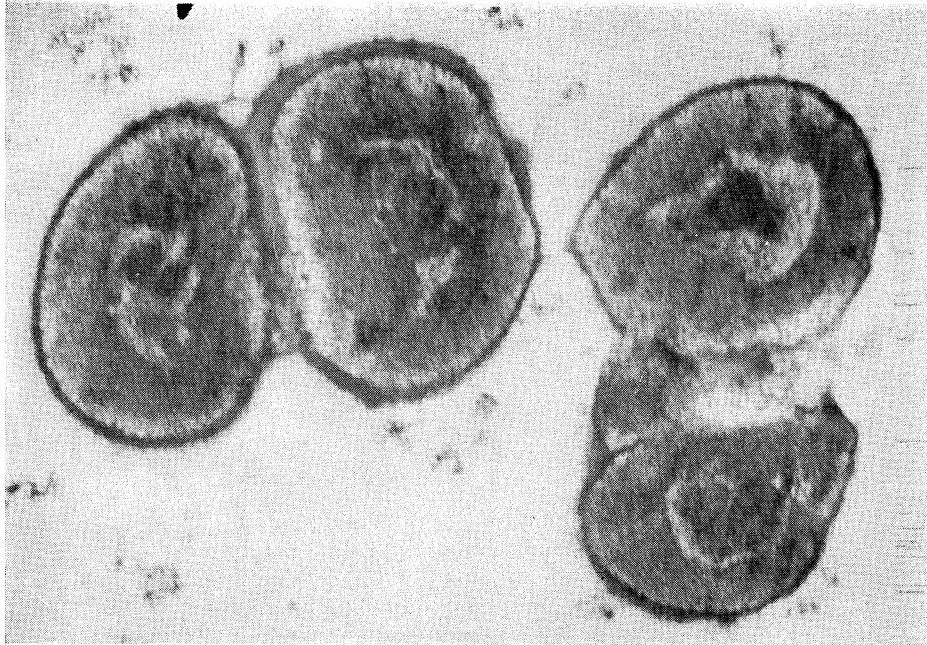


Figura 3. Cortes ultrafinos de M. morrhuae, fijados con permanganato potásico. $\times 87.000$



Figura 4. Cortes ultrafinos de M. morrhuae, fijados con tetraóxido de osmio. $\times 56.000$

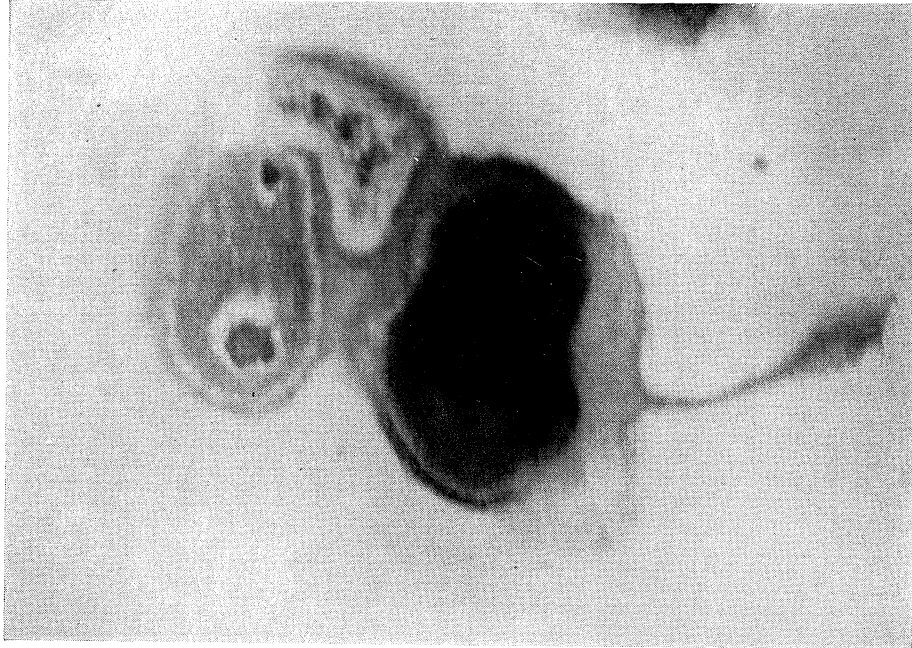


Figura 5. Cortes ultrafinos de M. morrhuae, fijados con tetraóxido de osmio. $\times 70.000$

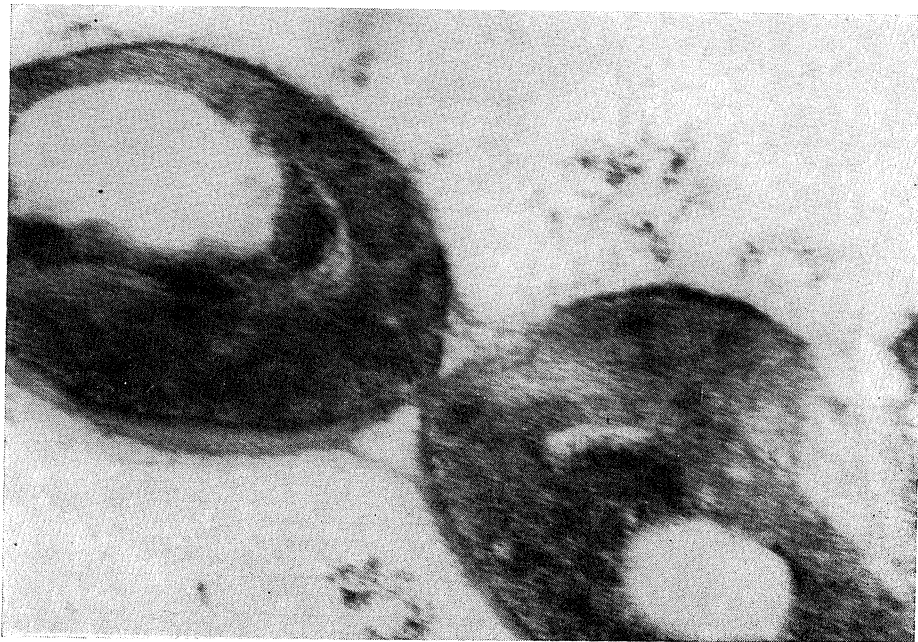


Figura 6. Cortes ultrafinos de M. morrhuae, fijados con tetraóxido de osmio. $\times 80.000$

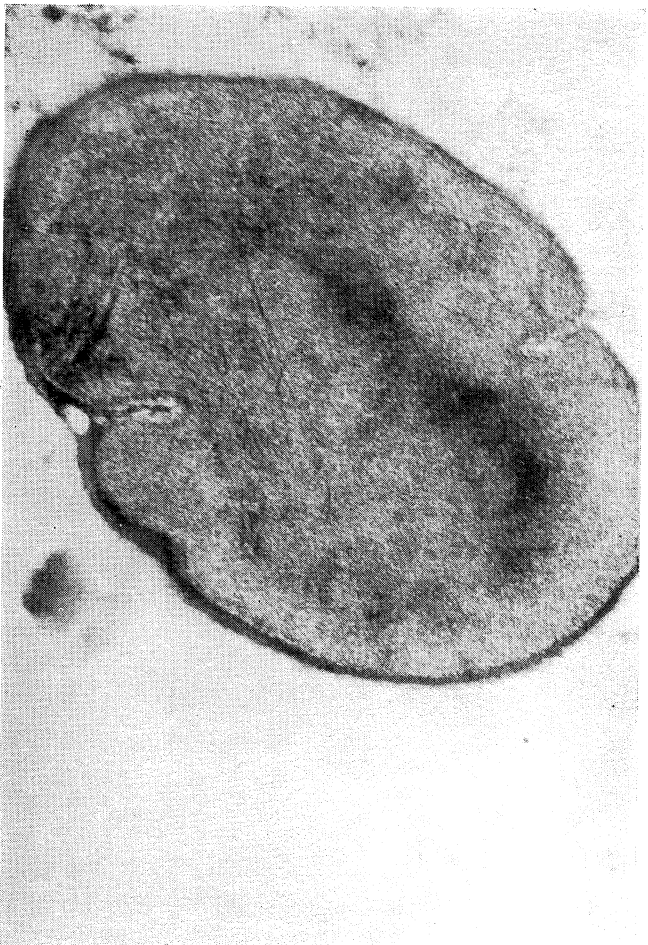


Figura 7. Cortes ultrafinos de *M. mortuaria*, fijados con tetraóxido de osmio. $\times 64.000$

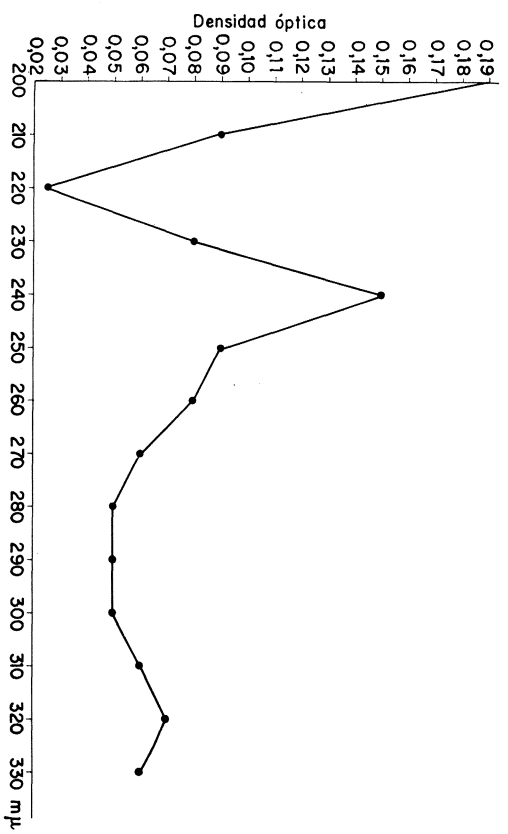


Figura 8

Entre los monosacáridos se hallan glucosa, galactosa, ramnosa, glucosamina y galactosamina, expresados por orden directo de su mayor proporción. Los Rf sobre placa fina de silicagel G, según el método de Gal (7) en el solvente propanol-n-agua (7:1, v/v) fueron, respectivamente, los siguientes: 0,59, 0,54, 0,71, 0,23, y 0,18; se identificó otro monosacárido con Rf = 0,66, sensible al revelado con plata alcalina, pero no al reactivo de Elson y Morgan ni a la ninhidrina.

DISCUSION

Nuestras conclusiones no son comparables con trabajos anteriores, ya que, como se indicaba en la introducción, no conocemos ninguna publicación sobre la ultraestructura y análisis químico de las paredes celulares de halococos extremos (género *Micrococcus*). Existen, sin embargo, publicaciones sobre especies del género *Halobacterium*, cuyas propiedades y características son bien diferentes.

El crecimiento del *Micrococcus morrhuae* no se inhibe por la adición de la penicilina a las dosis ensayadas, mientras que la cicloserina detiene el crecimiento a una concentración de 0,8 mg/ml. La penicilina inhibe el crecimiento del *Halobacterium salinarium* (18). Resulta complicado explicar el comportamiento del halococo frente a la penicilina, pero la acción de la cicloserina muestra una posible interferencia con la síntesis del mucopéptido (17 y 30).

En las paredes aisladas de este microorganismo, observadas al microscopio electrónico, no encontramos ninguna estructura, contrariamente a lo observado por diferentes investigadores en paredes de halobacilos obligados (8, 12 y 15) (figura 2).

En los cortes ultrafinos del *Micrococcus morrhuae*, sobre todo en aquellos que han sido fijados con permanganato potásico (figura 3), se observa que la capa más externa de la pared celular está formada por una "unidad de membrana", semejante a la que se encuentra en la gran mayoría de los microorganismos gram-negativos, y que químicamente está compuesta de lipoproteína y lipopolisacárido. La capa que se encuentra a continuación, no se tiñe con el permanganato potásico, aunque lo hace con el tetraóxido de osmio y correspondería al mucopéptido de la pared (figuras 4-7). En especies de *Halobacterium*, Brown y Shorey (2-3) com-

prueban la existencia de "unidad de membrana" en la pared celular, y Stoeckenius y Rowen (27), una estructura como pared celular.

En el análisis químico se ha de destacar la existencia de ácido diaminopimélico, constituyente típico de la pared celular en la parte proteica, y ácidos grasos libres y triglicéridos en la lipídica. En los halobacilos, la lipoproteína ha sido estudiada, entre otros, por Kushner y colaboradores (11) y Smithies y colaboradores (27), y los lípidos, por Marshall y Brown (14) y Kates y colaboradores (9). Se ha de señalar que Cho y Salton (5) indican la casi completa ausencia de ácidos grasos en los lípidos de *Halobacterium salinarium*, contrariamente a lo que ocurre en los hidrolizados de los lípidos bacterianos y en el *Micrococcus morrhuae*, estudiado por nosotros.

El pigmento rojizo, hallado por nosotros, juntamente con la grasa, se encuentra corrientemente en los halobacilos y su función parece ser protectora frente a las radiaciones solares.

Los aminoácidos identificados de la proteína de la pared celular (ácido diaminopimélico, ácido aspártico, ácido glutámico y lisina) son componentes típicos del mucopéptido de la pared celular de los microorganismos gram-negativos. Es de reseñar la notable diferencia con el género *Halobacterium*, que carece de ácido diaminopimélico (13) y, por el contrario, hay un predominio de aminoácidos de carácter ácido en *Micrococcus morrhuae*, como ocurre en los halobacilos (1, 13 y 28).

No se ha podido identificar el ácido murámico entre los monosacáridos de la pared celular del halococo (glucosa, galactosa, glucosamina, galactosamina y un monosacárido no identificado reductor y no aminado), lo que pudiera ser debido a encontrarse en muy pequeña proporción o, acaso, a algún proceso hidrolítico. Sin embargo, el comprobar la presencia de glucosamina, juntamente con ácido diaminopimélico, entre los componentes de la pared, nos induce a pensar que su composición química no difiere fundamentalmente de la de otros microorganismos gram-negativos (el *Micrococcus morrhuae* se comporta como gram-variable).

Por el contrario, se han de destacar las notables diferencias que separan el género *Micrococcus* del *Halobacterium*, aunque requieran ambos para su crecimiento elevadas proporciones de ClNa, y justifican plenamente su distinta clasificación dentro de la taxonomía bacteriana, que ha de fundamentarse, no sólo en los caracteres morfológicos, sino en la estructura química de la pared celular.

RESUMEN

1. Los cortes ultrafinos de las paredes celulares del *Micrococcus morrhuae*, halófilo obligado y gram-variable, presentan una "unidad de membrana", semejante a la que se encuentra en la gran mayoría de bacterias gram-negativas.

2. Las paredes aisladas no muestran estructura especial alguna al microscopio electrónico.

3. El análisis químico de la lipoproteína extraída revela la existencia de ácido diaminopimélico en la parte proteica, y ácidos grasos libres, triglicéridos y un pigmento probablemente carotinoide, en la lipídica.

4. En el hidrolizado del mucopéptido se identifican ácido diaminopimélico, ácido aspártico (comparativamente, en la mayor proporción), ácido glutámico y lisina entre los aminoácidos; y entre los monosacáridos, glucosa, galactosa, ramnosa, glucosamina, galactosamina y otro, reductor no aminado, no identificado.

5. *Micrococcus morrhuae* no es sensible a la acción de la penicilina, pero la cicloserina inhibe su crecimiento.

SUMMARY

1. Thin sections of the cell wall of the *Micrococcus morrhuae*, obligate halophile and Gram-variable, present a unit membrane similar to the one found in the majority of Gram-negative bacteria.

2. The isolated cell walls do not show any special surface structure under the electronic microscope.

3. The chemical analysis of the extracted lipoprotein reveals the existence of diaminopimelic acid in the protein part and, in the lipid part, free fatty acids, triglycerides and a carotinoid pigment.

4. By hydrolisis of the mucopeptides, diaminopimelic acid, aspartic acid (in a somewhat greater proportion), glutamic acid and lysin among the amino acids were identified; in the monosaccharides, glucose, galactose, ramnose, glucosamine, galactosamine and another unaminated unknown with reductive properties were found.

5. *Micrococcus morrhuae* is not sensitive to the action of penicillin, but the cycloserine inhibits its growth.

BIBLIOGRAFIA

1. BROWN, A. D. 1963. The peripheral structure of Gram negative bacteria. IV. The cation-sensitive dissolution of the cell membrane of the halophilic bacterium *Halobacterium halobium*. Biochim. Biophys. Acta, 75, 425.
2. BROWN, A. D., y SHOREY, C. D. 1962. Preliminary observations on the cell envelopes of two species of *Halobacterium*. Biochim. Biophys. Acta, 59, 258.
3. BROWN, A. D., y SHOREY, C. D. 1963. The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria. J. Cell Biol., 18, 681.
4. CUMMINS, C. S., y HARRIS, H. 1958. Studies on the cell wall composition and taxonomy of Actinomycetals and related groups. J. Gen. Microbiol., 18, 173.
5. CHO, K. Y., y SALTON, M. R. J. 1966. Fatty acid composition of bacterial membrane and wall lipids. Biochim. Biophys. Acta, 116, 73.
6. ELSON, L. A., y MORGAN, W. T. J. 1933. A colorimetric method for the determination of glucosamine and condrosamine. Biochem. J., 27, 1.824.
7. GAL, A. E. 1968. Separation and identification of monosacharides from biological materials by thin layer chromatography. Anal. Biochem., 24, 452.
8. HOUWINK, A. C. 1956. Flagella, gas vacuoles and cell wall structure in *Halobacterium halobium* and electron microscope study. J. Gen. Microbiol., 15, 146.
9. KATES, M.; SASTRY, P. S., y YENGOYAN, L. S. 1963. Isolation and characterization of a dieter analog of phosphatidyl-glycerophosphate from *Halobacterium cutirubrum*. Biochim. Biophys. Acta, 70, 705.
10. KELLEY, T. F. 1966. Separation with unidimensional TLC of all neutral lipid classes. J. Chromatogr., 22, 456.
11. KUSHNER, D. J.; BAYLEY, S. T.; BORING, J.; KATES, M., y GIBBONS, N. E. 1964. Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Microbiol., 10, 483.
12. KUSHNER, D. J., y ONISHI, H. 1966. Contribution of protein and lipid components to the salt response of envelopes of an extremely halophilic bacterium. J. Bacteriol., 91, 653.
13. KUSHNER, D. J., y ONISHI, H. 1968. Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Biochem., 46, 977.
14. MARSHALL, C. L., y BROWN, A. D. 1968. The membrane lipids of *Halobacterium halobium*. Biochem. J., 110, 441.
15. MOHR, V., y LARSEN, H. 1963. On the structural transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* in hypotonic and isotonic solutions. J. Gen. Microbiol., 31, 267.
16. ONISHI, H.; MACCANCE, M. E., y GIBBONS, N. E. 1965. A synthetic medium for extremely halophilic bacteria. Can. J. Microbiol., 11, 365.
17. PARK, J. T. 1966. Some observations on murein synthesis and the action of penicillin. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 16, 70.

18. RODRÍGUEZ-REBOLLO, M., y GONZÁLEZ, C. 1967. Efectos de antibióticos, hidrazida del ácido isonicotínico y sales de amonio cuaternario sobre bacilos halófilos aislados del "rojo del bacalao". Rev. Patr. Biol. Animal, 11, 155.
19. RODRÍGUEZ-REBOLLO, M., y GONZÁLEZ, C. 1969. Morphological transformations and lysis of *Halobacterium salinarum* by 4-(2,4-dichlorophenoxy) butyric acid and related compounds. Can. J. Microbiol., 15, 309.
20. SALTON, M. R. J. 1959. An improved method for the detection of N-acetylamino sugars on paper chromatograms. Biochim. Biophys. Acta, 34, 309.
21. SALTON, M. R. J., y HORNE, R. W. 1951. Studies on the bacterial cell wall.
* II. Methods of preparations and some properties of cell wall. Biochim. Biophys. Acta, 7, 177.
22. SANTAOLALLA, M. 1963. Obtención y análisis químico de la pared celular del *Agrobacterium tumefaciens* y de sus formas L fijas. Microbiol. Españ., 16, 25.
23. SANTAOLALLA, M. 1967. Obtención y análisis químico de paredes celulares de *Corynebacterium sepeidonicum*. Microbiol. Españ., 20, 87.
24. SEHGAL, S. N., y GIBBONS, N. E. 1960. Effect of metal ions on the growth of *Halobacterium cutirubrum*. Can. J. Microbiol., 6, 165.
25. SCHLEIFER, K. H., y KANDLER, O. 1970. Amino acid sequence of the murein of *Planococcus* and other Micrococcaceae. J. Bacteriol., 103, 387-92.
26. SKIPSKI, V. P.; PETERSON, R. F., y BARCLAY, M. 1962. Separation of phosphatidylethanolamine, phosphatidylserine and other phospholipids by thin layer chromatography. J. Lipid Res., 3, 467.
27. SMITHIES, W. R.; GIBBONS, N. E., y BAYLEY, S. T. 1955. The chemical composition of the cell and cell wall of some halophilic bacteria. Can. J. Microbiol., 1, 605.
28. STOECKENIUS, W., y KUNAU, W. H. 1968. Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of *Halobacterium halobium* and isolation of gas vacuole membranes. J. Cell Biol., 38, 337.
29. STOECKENIUS, W., y ROWEN, R. 1967. A morphological study of *Halobacterium halobium* and its lysis in media of low salt concentration. J. Cell Biol., 34, 365.
30. STROMINGER, J. L. 1962. Biosynthesis of bacterial cell walls. Ref.: I. C. GUN-SALUS y R. Y. STANIER The Bacteria, 3, 413.
31. TREVELYAN, W. E.; PROCTER, D. P., y HARRISON, J. S. 1950. Detection of sugars on papers chromatograms. Nature, 166, 444.

DETERMINACION CUALITATIVA DE AMINOACIDOS Y AZUCARES LIBRES EN HOJA DE CEBADA SANA E INFECTADA CON LA ROYA (*)

por

F. D. CALONGE

INTRODUCCION

El estudio de las relaciones huésped-parásito en la roya de la cebada ha sido ya tratado con cierto detenimiento, tanto en lo que a la ultraestructura de este parasitismo se refiere (7), como en lo concerniente al contenido en clorofila y nitrógeno total en hoja infectada y sana (1).

El presente trabajo se ocupa de la composición cualitativa de aminoácidos y azúcares libres, haciendo un estudio comparativo entre los existentes en hoja de cebada sana y parasitada con la roya.

MATERIALES Y METODOS

Los materiales utilizados aquí son los mismos ya citados en anteriores trabajos (1). La colecta del material se hizo cuando sobre las hojas inoculadas aparecieron pústulas uredospóricas perfectamente visibles, es decir, al cabo de los ocho-diez días después de la inoculación. Una vez recogidas las hojas, procedimos a la extracción de los aminoácidos libres mediante el método de Patel y Walker (6), que emplea como líquido

(*) Este trabajo que forma parte de una tesis doctoral, se ha realizado mediante una beca del Ministerio de Educación y Ciencia a través del PIO, y se llevó a cabo en el Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología, del CSIC.

extractor una mezcla de acetona y agua a partes iguales. Después de obtenido el extracto acetónico conteniendo las aminoácidos libres, realizamos la determinación cualitativa de los mismos mediante técnicas de cromatografía descendente sobre papel, empleando papel Whatman, número 1.

En todos los experimentos realizados siempre se hicieron dos pruebas de un modo paralelo; una con planta infectada y otra con planta sana, ambas de la misma edad. El solvente empleado para las técnicas de cromatografía fue el de Palmade (5).

El tiempo que se mantuvo corriendo el solvente fue de treinta horas, a una temperatura ambiente de 20 °C. Como revelador empleamos una solución de ninhidrina al 0,25 % en acetona, adicionando un 7 % de ácido acético glacial.

Para la investigación de azúcares libres se empleó el mismo extracto acetónico obtenido anteriormente, verificando la identificación final mediante métodos cromatográficos. El solvente en este caso de los azúcares fue otro diferente, constituido a base de butanol-acetona-agua 40:50:10. Se mantuvo corriendo durante veinticuatro horas, para después de dejarlo secar completamente, someterlo a otro pase con el mismo solvente durante otras veinticuatro horas a la temperatura del laboratorio.

El proceso de revelado o detección de azúcares constó de tres partes:

a) *Aplicación del reactivo.* Sumergiendo el papel, una vez seco, de pasada rápida en una solución de nitrato de plata en acetona, al 5 %.

b) *Revelado de las manchas de azúcares.* Después de secarse el papel se roció, mediante un nebulizador, con una solución de sosa alcohólica, al 2 %.

c) *Fijación.* Dejamos secar el papel y a continuación lo sumergimos de pasada rápida en una solución de amoníaco, al 33 %. Con esta operación se consigue estabilizar las manchas obtenidas en el cromatograma, y evitar así que se deterioren con el tiempo.

RESULTADOS

El contenido de aminoácidos libres en el extracto de la hoja infectada con la roya se mostró idéntico con aquel otro procedente de la hoja sana (*figura 1*). Los aminoácidos identificados fueron los siguientes: cistina, asparagina, ácido aspártico, glicina, serina, ácido glutámico, treonina, alanina, tirosina, valina, isoleucina y leucina.

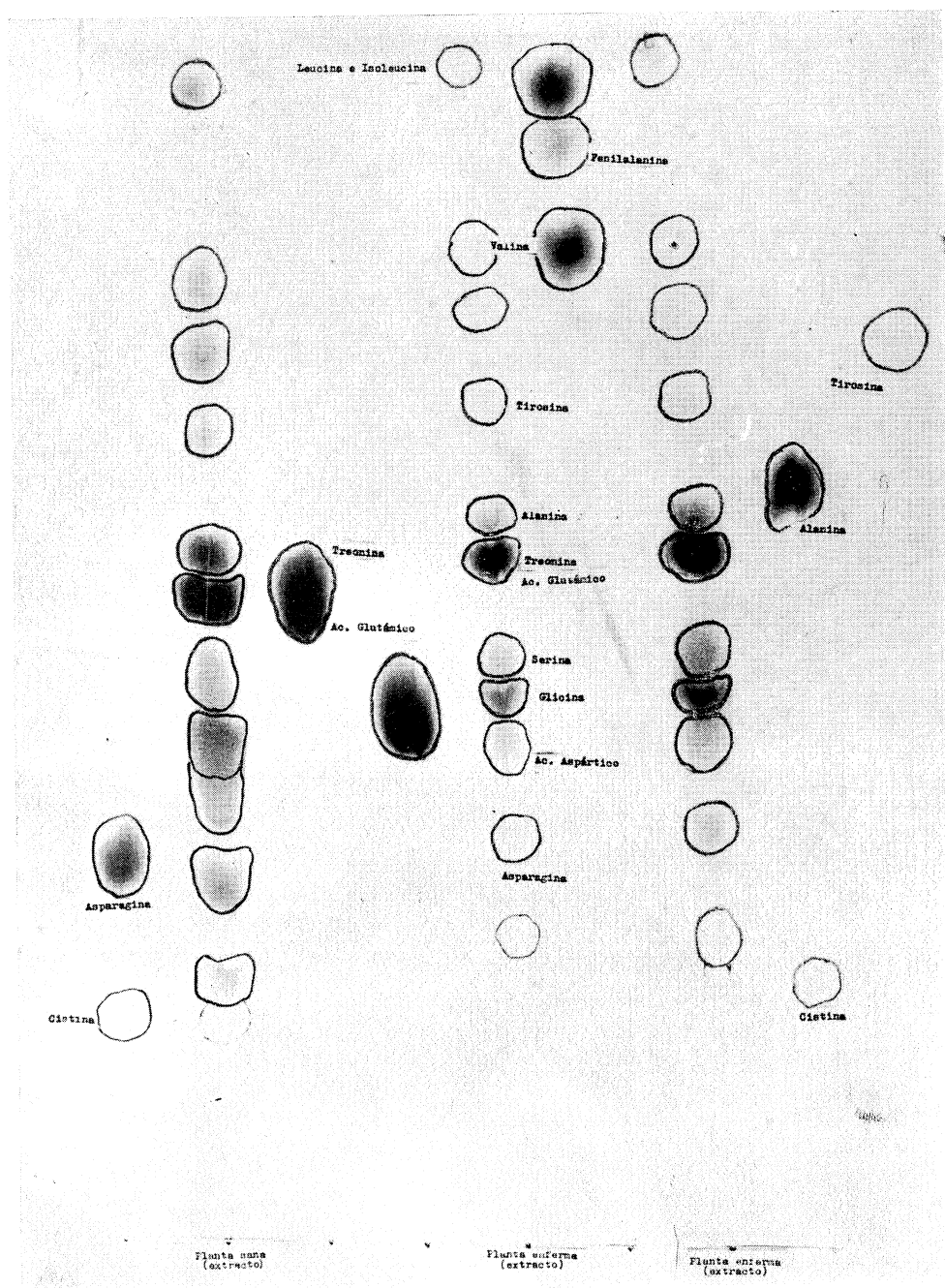


Figura 1. Cromatograma mostrando los aminoácidos libres identificados en hoja de cebada sana y en hoja de cebada infectada con la roya

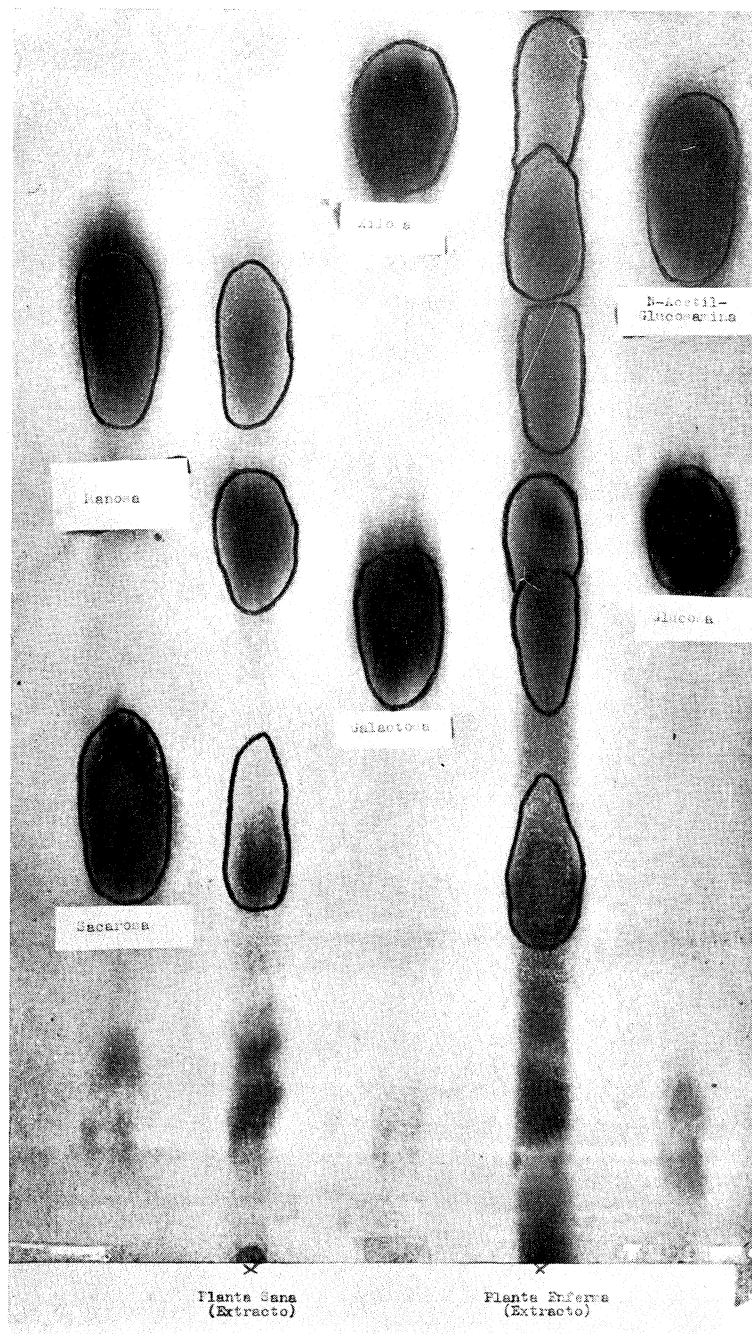


Figura 2. Cromatograma mostrando los azúcares libres identificados en hoja de cebada sana y en hoja de cebada infectada con la roya

Por otro lado, la composición en azúcares libres de ambos extractos fue diferente (*figura 2*). Así, pues, mientras en la hoja sana sólo pudieron ser detectados la sacarosa, glucosa y manosa, en la hoja infectada se encontraron además de éstos la galactosa, xilosa y N-acetilglucosamina.

DISCUSION

De los resultados conseguidos en el curso de esta investigación se deduce que no existen diferencias apreciables, desde el punto de vista cualitativo, entre los aminoácidos libres de la hoja de cebada sana y la infectada con la roya. No obstante este hecho, es muy posible que sí haya diferencias notables entre ambos tipos de hojas en el aspecto cuantitativo. Estudios realizados con otras variedades de cebada sana han demostrado que la concentración de aminoácidos libres varía considerablemente de unos mutantes a otros, y que estas variaciones van disminuyendo con la edad (4).

Por otro lado, la presencia del hongo dentro del huésped debe inducir, necesariamente, ciertos cambios metabólicos en éste que le obliguen a producir una mayor cantidad de unos determinados aminoácidos y no de otros. Trabajos preliminares llevados a cabo con esta misma roya de la cebada y con la misma variedad de planta huésped, nos han revelado cómo la concentración de nitrógeno total es superior en la hoja infectada que en la sana (1), lo cual nos sugiere la posibilidad de que, en efecto, esta diferencia sea en parte debida a una diferente concentración también en los aminoácidos libres existentes en la hoja parasitada.

Investigaciones realizadas en el caso de la roya amarilla del trigo, *Puccinia striiformis* West., sobre la asimilación y translocación del carbono en la planta huésped, han dado como resultado la observación de un descenso del 43,5 % en la asimilación del carbono marcado utilizado, con respecto a la planta sana (3).

Shaw y Colotelo (8) han demostrado cómo en infecciones de trigo con la roya *Puccinia graminis tritici* Pers., se produce un incremento en la concentración de aminoácidos libres después de los nueve días de la inoculación. Mediante técnicas de microautorradiografía se ha comprobado cómo en la roya de las judías, *Uromyces phaseoli* Wint., tiene lugar una síntesis de proteínas por el propio hongo durante su parasitismo dentro del huésped (9-10).

Con respecto a los azúcares libres encontrados en la hoja infectada, la presencia de galactosa y xilosa nos sugiere su procedencia a partir de las paredes celulares de la planta huésped, mediante un proceso hidrolítico provocado por el equipo enzimático del parásito; mientras que la N-acetilglucosamina posiblemente sea de origen fúngico, puesto que el principal componente de la pared celular de los Basidiomicetos es la quitina, que es un polímero de la N-acetilglucosamina (2).

Finalmente, pensamos que sería de un gran interés el conseguir datos sobre la concentración tanto de azúcares como de aminoácidos libres en esta infección, para alcanzar un mayor conocimiento en la fisiología de las relaciones huésped-parásito.

RESUMEN

En este trabajo se exponen los resultados conseguidos en la determinación cualitativa de aminoácidos y azúcares libres, en la roya de la cebada, mediante técnicas de cromatografía sobre papel.

Mientras que no se han encontrado diferencias apreciables en el caso de los aminoácidos, tres azúcares aparecieron en el extracto de planta enferma que no se observaron en el de la sana. Estos fueron: galactosa, xilosa y N-acetilglucosamina.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi gratitud al Prof. A. Branquinho D'Oliveira, quien sugirió este trabajo durante mi estancia en la Estação Agronómica Nacional de Oeiras, Portugal. Así como al Dr. M. Rubio-Huertos, por sus inestimables ayuda y guía durante la realización del mismo. También agradezco al Sr. R. Nevado Escobar su colaboración fotográfica.

SUMMARY

Qualitative paper chromatographic determinations have been carried out on the free amino acids and sugars of the primary healthy leaves of barley, and the infected with *Puccinia hordei* Otth.

The amino acid composition showed no differences between the healthy and infected leaves: cystine, asparagine, aspartic acid, glycine, serine, glutamic acid, threonine, alanine, tyrosine, valine, isoleucine and

leucine were found in both types of leaves. The healthy leaves exhibited: sucrose, glucose and mannose as free sugars; while the infected ones showed: sucrose, glucose, mannose, galactose, xylose and N-acetylglucosamine. The significance of these results is discussed in this paper.

BIBLIOGRAFIA

1. CALONGE, F. D. 1967. Chlorophyll and total nitrogen in barley rust infection. Trans. Brit. Mycol. Soc., 50, 397-401.
2. COCHRANE, V. W. 1958. Physiology of Fungi. Wiley and Sons, Nueva York.
3. DOODSON, J. K.; MANNERS, J. G., y MYERS, A. 1965. Some effects of yellow rust (*Puccinia striiformis*) on 14 carbon assimilation and translocation in wheat. J. Exp. Bot., 16, 304-17.
4. MACLACHLAN, S., y ZALIK, S. 1963. Plastid structure, chlorophyll concentration and free amino acid composition of a chlorophyll mutant of barley. Can. J. Bot., 41, 1.053-62.
5. PALMADE, C.; CHEVALLIER, M. R.; KNOBLOCH, A., y VENDRELY, R. 1958. Isolement d'une desoxyribonucleohistone a partir d'*Escherichia coli*. Compt. Rend., 246, 2.534-39.
6. PATEL, P. N., y WALKER, J. C. 1963. Extraction of the free amino acids from a vegetal tissue. Rev. Phytopathol., 53, 522-28.
7. RUBIO-HUERTOS, M., y DIEGO-CALONGE, F. 1965. Estudio histocitológico mediante microscopía normal y electrónica de la infección por *Puccinia hordei* Otth. Microbiol. Españ., 18, 127-42.
8. SHAW, M., y COLOTELO, N. 1961. The physiology of host-parasite relations. VII. The effect of stem rust on the nitrogen and amino acids in wheat leaves. Can. J. Bot., 39, 1.351-72.
9. STAPLES, R. C., y LEDBETTER, M. C. 1958. A study by microautoradiography of the distribution of tritium-labelled glycine in rusted pinto bean leaves. Contrib. Boyce Thompson Inst., 19, 349-54.
10. STAPLES, R. C., y STAHMANN, M. A. 1963. Changes in proteins and several enzymes in susceptible bean leaves after infection by the bean rust fungus. Phytopathology, 54, 760-64.

INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA (C S I C)
DEPARTAMENTO DE VIROLOGÍA
SECCIÓN DE VIRUS ANIMALES

SENSIBILIDAD DE LA CEPA "FERRAN", DE CELULAS DE RIÑÓN DE CERDO, A SU INFECCION POR VIRUS (*)

por

CARMEN GIL - FERNÁNDEZ

INTRODUCCION

A partir del establecimiento de dos cepas de células de riñón de cerdo, que hemos denominado cepas "Ferrán" y GM (3), nos propusimos estudiar el comportamiento en ambas del virus de la peste porcina africana, y tratar de adaptarlo al crecimiento sobre las mismas, observando los efectos citopáticos producidos en los cultivos. Consideramos también interesante estudiar la susceptibilidad de estas cepas a diversos virus.

La posibilidad de disponer de células que como la cepa "Ferrán" conservan su configuración diploide tiene gran importancia, como hace resaltar Hayflick en 1962 (4), por motivos de su utilización práctica, como son: la producción de vacunas, estudio de la posible acción cancerígena de determinados productos, estudios sobre el comportamiento de células humanas normales *in vitro*, espectro de los virus que pueden multiplicarse en ellas, etc.

(*) Este trabajo forma parte de un proyecto de investigación subvencionado por el Primer Plan de Desarrollo Económico. Director del proyecto: A. García Gancedo.

Las células diploides se diferencian de las líneas de células establecidas en cultivo permanente, en que estas últimas se vuelven heteroploides y adquieren propiedades que las asemejan a las células tumorales. Los cultivos de células diploides tienen una vida limitada en general, no superior a los 50 pases, mientras que las líneas de células establecidas, con su cariotipo modificado, volviéndose en general heteroploides, pueden multiplicarse indefinidamente.

En 1962, Hayflick y colaboradores (5) usaron células diploides para preparar vacunas vivas contra la poliomielitis, que se administraron a seres humanos; estas células humanas diploides son más idóneas que los cultivos primarios para la producción de vacunas, por estar exentas de virus latentes.

En el presente trabajo nos limitamos a describir nuestros estudios sobre la sensibilidad de la cepa "Ferrán" a la infección por diferentes virus, para completar la caracterización de esta cepa, cuyo cariotipo quedó descrito en nuestro artículo antes mencionado (3).

MATERIAL Y TECNICAS

Las células de riñón de cerdo, de la cepa "Ferrán" establecida por nosotros, han sido las que hemos utilizado para nuestro estudio empleando los pases comprendidos entre el 10 y el 20, en cuyo transcurso se encontraban las células en su fase de máximo crecimiento, formando una monocapa continua a los cuatro o cinco días después de su tripsinización.

Medios de cultivo

El medio de crecimiento se compone de 82 cm³ de solución de Hanks conteniendo 4 cm³ de lactoalbúmina hidrolizada al 5 %, 10 cm³ de suero de ternera, 5 cm³ de extracto de levadura al 1 %, 1 cm³ de rojo fenol al 2 %, 10.000 U I de penicilina y 10.000 µg de estreptomicina.

El medio de mantenimiento que se añade a los cultivos después de la infección de virus tiene la misma composición que el anterior, con un 5 % de suero de ternera en lugar del 10 %.

Virus

Se han utilizado los virus siguientes:

Neurovacuna, virus procedente de pulpa vacunal de ternera adaptada a cerebro de conejo por 15 pases consecutivos.

Helavacuna, cepa de virus del mismo origen que el anterior, adaptada al cultivo en células HeLa a través de 33 pases consecutivos.

Herpes simplex, cepa *LF*, aislada por el Dr. Gallardo y mantenida en nuestro laboratorio en cerebro de conejo por 15 pases consecutivos y posteriormente adaptada a células HeLa.

Cepa HFEM de virus herpes simplex, cedida por el Dr. Stoker, mantenida en nuestro laboratorio a través de pases en membrana corio-alantoidea de embrión de pollo.

Encefalitis equina Este, virus aislado de una epidemia en California, en 1933.

Encefalitis equina Oeste, virus aislado por el Dr. Howitt en California.

Encefalitis de San Luis, cepa *Webster*.

Encefalitis japonesa B, cepa *Nakayama*.

Procedentes de la colección del Instituto Superior de Sanidad de Roma:

Poliomielitis tipo 1.

Sindbis.

Teschen (enterovirus porcino).

PQ (enterovirus porcino).

SV40.

Sendai (parainfluenza 1).

Australia 57 (influenza).

Cedidos por el Prof. Schäffer:

Peste aviar clásica.

Pseudopeste aviar.

Peste porcina africana, donada por el Prof. Sánchez Botija.

Inoculación de los cultivos

Las células se mantienen en frascos; una vez formada la monocapa, se someten a la acción de la tripsina al 0,25 %, previos dos lavados con solución de Hanks.

La tripsina se dejaba actuar durante dos-tres minutos, tirándola después y añadiendo medio de cultivo a los frascos para dispersar las células que se pipetea con pipeta con pera de goma adosada a su extremo. Una vez que la dispersión de las células es homogénea, se distribuyen en series de 4 tubos de ensayo, a razón de 200.000 células/tubo. Cuando las células forman en ellos una monocapa, se descarta el medio de cultivo, lavando las células dos veces con solución de Hanks, y se añade a cada tubo 0,1 cm³ de la suspensión de virus, a distinta dilución para cada serie de tubos. (Las diluciones de los virus fueron 10⁻², 10⁻³ y 10⁻⁴.) Después de un período de adsorción de dos horas, a 37 °C, se retira el virus y se vuelve a lavar la monocapa celular con solución de Hanks, para eliminar el virus que no ha sido adsorbido. Los tubos se observan diariamente por un tiempo de siete-diez días para comprobar la presencia de efectos citopáticos en las células.

RESULTADOS

En el *cuadro 1* se resumen los resultados de los experimentos llevados a cabo con las 18 cepas de virus, y en la *figura 1* se muestra el aspecto de la monocapa celular de la cepa "Ferrán", sin inocular por virus.

De los virus ensayados, el virus de la poliomielitis y el SV40 no se han multiplicado en la cepa "Ferrán". Los virus de la encefalitis equina Oeste, la encefalitis japonesa B, encefalitis de San Luis, el Sindbis y el virus de la peste porcina africana, no presentan efecto citopático en las células, en el primer pase, siendo necesario hacer pases sucesivos hasta su adaptación. Con este último virus, los efectos no aparecen en la totalidad de los cultivos pertenecientes al mismo pase e inoculados con la misma dilución de virus.

Con los restantes virus se observan los efectos citopáticos a partir del primer pase.

De las dos cepas ensayadas de virus vacunal, la adaptada a células HeLa se multiplica más rápidamente que la neurovacuna, destruyendo el cultivo a los tres días, mientras que la cepa adaptada a cerebro de conejo tarda cinco días en destruirlo (*figura 2*).

De las dos cepas de virus herpes simplex, la cepa LF (*figura 3*) adaptada a células HeLa después de diversos pases en cerebro de conejo, produce la lisis de las células a los tres días, y la cepa HFEM, mantenida

por pases en membrana corio-alantoidea de embrión de pollo, tarda un día más en producir los mismos efectos.

Los efectos citopáticos observados pueden resumirse como sigue: con el virus de la peste porcina africana, en los casos positivos, a partir del 5.º pase se comprueba la aparición de microplacas de células redondeadas, como las que se encuentran en la *figura 4*.

Los virus de las encefalitis equinas Este y Oeste, como puede observarse en las *figuras 5-6*, producen un redondeamiento de las células, notándose un ligero aumento de tamaño con el virus de la encefalitis equina Oeste; las células infectadas con ambos virus se desprenden de la superficie del tubo. Con el virus de la influenza de Australia 57 también se redondean a partir de las dieciséis horas y se desprenden de la monocapa (*figura 7*).

El virus herpes simplex y el vacunal forman sincitios, observándose puentes citoplásmicos entre las células infectadas. Con el virus Sendai estas prolongaciones citoplásmicas uniendo las células infectadas son más numerosas, iniciándose a las catorce horas; a las veinticuatro horas, como se observa en la *figura 8*, numerosas células aparecen unidas por una red citoplásmica y a las cuarenta y ocho horas después de la infección todas las células del cultivo infectado presentan sus citoplasmas retraídos, pero continúan relacionadas entre sí merced a los citados puentes citoplásmicos.

El virus Sindbis no acusa efectos sobre los cultivos en el primer pase, pero a partir del segundo (*figura 9*) pueden observarse microplacas formadas por células redondeadas de tamaño ligeramente mayor que el normal que forman focos de degeneración, que se desprenden y dan lugar a los orificios desprovistos de células que llegan a aumentar de tamaño hasta hacerse visibles macroscópicamente. Estos orificios o placas se presentan igualmente en el caso de los virus herpes simplex y vacunal.

Los virus de la encefalitis japonesa B (*figura 10*) y de San Luis (*figura 11*) originan unos efectos similares, con formación de acúmulos de células degeneradas que se desprenden rompiendo la continuidad de la monocapa.

Por lo que se refiere a los virus de la peste aviar clásica y la pseudo-peste aviar (*figuras 12-13*) producen la destrucción de las células, cuyo citoplasma aparece lleno de gránulos, destacando el núcleo como un espacio hialino en el centro de la célula.

Cuadro 1. Suceptibilidad de la cepa "Ferrán"

Grupo y cepa de virus	Aparición de los efectos citopáticos		
	Pase 1.º	Pases sucesivos	
<i>Poxvirus</i>			
Neurovacuna	+		
Helavacuna	+		
<i>Herpes</i>			
Herpes simplex, cepa LF	+		
Herpes simplex, cepa HFEM	+		
<i>Arbovirus</i>			
Encefalitis equina Este	+		
Encefalitis equina Oeste	—	+	
Encefalitis de San Luis	—	+	
Encefalitis japonesa B, cepa Nakayama	+		
Sindbis	—	+	
<i>Mixovirus</i>			
Sendai, parainfluenza 1	+		
Peste aviar clásica	+		
Pseudopeste aviar	+		
Australia 57, influenza	+		
<i>Picornavirus</i>			
Poliomielitis tipo 1	—	—	
Teschen (enterovirus porcino)	+		
PQ (enterovirus porcino)	+		
<i>Papovavirus</i>			
SV40	—	—	
<i>Sin clasificar</i>			
Peste porcina africana	—	+	—

La presencia de efectos citopáticos se indica por el signo +. El signo — repr
 Los diferentes grados de efectos citopáticos se señalan por varios + cuando
 D == Destrucción total del cultivo.

as de riñón de cerdo, a la infección por virus

Días después de la inoculación en que aparecen los efectos citopáticos							Pase en el que aparecen los efectos
	3	4	5	6	7	8	
-	++	+++	D				3.º
-+	D						3.º
-+	D						3.º
+	++	D					3.º
-	++	D					4.º
+	++	D					4.º
-	++	+++	D				3.º
-	+	+	++	+++	D		4.º
)							3.º
-+	D						3.º
+	+++	D					3.º
-+	D						3.º
-	++	++	+++	+++	D		4.º
-	++	+++	D				3.º
							4.º
	+	++	++	++	+++	D	5.º

ausencia de dichos efectos.
acentuados.

DISCUSION

Como ha podido verse a lo largo del trabajo, la cepa "Ferrán" de células de riñón de cerdo, muestra una gran sensibilidad a la infección por virus perteneciente a diferentes grupos; entre los virus ARN: los Picornavirus, Arborivirus, Mixovirus; y dentro de los ADN, el grupo del Herpesvirus y de los Poxvirus.

De todos los virus ensayados, el virus de la poliomielitis y el SV40 no se han multiplicado en estas células, pero es bien conocido que el primero de ellos sólo se multiplica en células de origen humano y en las procedentes de primates (2). Hay que hacer notar que Holland y colaboradores (6) han logrado la infección de células de distintas especies de animales, pero a condición de inocular únicamente el ARN del virus de la poliomielitis desprovisto de su envoltura. Posteriormente, Hull y Tritch (7) señalan la multiplicación del virus de la poliomielitis en células de riñón de embrión de conejo, cepa ERK-1.

En cuanto al virus SV40, después de su aislamiento sólo se cultivaba en células de *Cercopithecus aethiops*, aunque luego se consiguió adaptarle a células de otros primates y posteriormente se cultiva en células embrionarias de origen humano; en estas células observaron Shein y Anders en 1962 (10), por primera vez, que sufrían una transformación tumoral.

La aparición más rápida de los efectos citopáticos en la cepa de He-lavacuna, en comparación con la neurovacuna en lo que respecta al virus vacunal y de la LF comparada con la HFEM, del virus herpes simplex puede explicarse a nuestro juicio por su adaptación anterior a células HeLa. Este mismo hecho ha sido señalado por Taniguchi y Yoshino (11), que encuentran siempre mejor crecimiento y rendimiento en virus en las cepas que están adaptadas a un determinado cultivo, cuando su titulación se realiza en el mismo cultivo de células o tejido a las que previamente han sido adaptados.

Como hemos visto, virus pertenecientes a grupos dispares pueden manifestar efectos citopáticos similares. Roizman (8) afirma que las células responden de un modo semejante, no sólo a la acción de aquéllos, sino también a determinados productos químicos, como ciertos líquidos y otras sustancias como la hormona paratiroidea. Posteriormente, Roiz-

man y colaboradores (9) señalan que el virus herpes simplex inoculado a distintas líneas celulares produce efectos diferentes.

Otros autores (1) señalan que las distintas cepas de virus herpes simplex ofrecen diferentes efectos citopáticos en los cultivos celulares, según su procedencia, achacándolo a que las diversas cepas de virus modifican de modo distinto la composición química de la membrana celular, llevando consigo un distinto grado de adhesión de las células infectadas, lo que tiene como consecuencia un comportamiento diferente en la manera de agruparse las células infectadas.

Queda aún mucho por investigar acerca de las modificaciones que sufren las membranas de las células infectadas, inducidas por ciertos productos de los virus que se sirven de ellas en ciertos casos para formar su cubierta. Estos productos son también los responsables de sus propiedades antigénicas, contribuyendo, así, al comportamiento característico de las células infectadas.

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la susceptibilidad de la cepa "Ferrán" en los pases comprendidos entre el 10 al 20, a diferentes virus. Con excepción de los virus de la poliomielitis y el SV40, estas células han demostrado su capacidad para mantener la multiplicación de virus de los grupos Herpesvirus, Poxvirus, Picornavirus, Arbovirus, Mixovirus y virus de la Peste Porcina Africana.

Se estudian también los efectos citopáticos que producen los diferentes virus sobre estas células.

SUMMARY

The susceptibility of the "Ferrán" strain of pig kidney cells to be infected by viruses, between the 10th and 20th passage level, has been studied.

With the exception of poliomyelitis and SV40 viruses, this strain was found to support virus growth of different groups of viruses: Herpes-, Pox-, Picorna-, and Mixo-, as well as, the African swine fever virus.

The cytopathic effects produced by the viruses on the cells have also been studied.

BIBLIOGRAFIA

1. EJERCITO, P. M.; KIEFF, E. D., y ROIZMAN, B. 1968. Characterization of Herpes simplex virus strains differing in their effect on social behavior of infected cells. *J. Gen. Virol.*, 3, 357-64.
2. ENDERS, J. F.; WELLER, T., y ROBBINS, F. 1949. Cultivation of the Lansing strains of poliomyelitis virus in cultures of various embryonic tissues. *Science*, 109, 85-87.
3. GIL-FERNÁNDEZ, C., y VILAS-MINONDO, P. 1970. Establecimiento de dos cepas de células de riñón de cerdo. *Microbiol. Españ.*, 23, 23-46.
4. HAYFLICK, L., y CHU, E. H. Y. 1962. Chromosomal stabilization. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 7, 63.
5. HAYFLICK, L.; PLOTKIN, S. A.; NORTON, T. W., y KOPROWSKI, H. 1962. Preparation of poliovirus vaccines in a human fetal diploid cell strain. *Am. J. Hyg.*, 75, 240-45.
6. HOLLAND, J. J.; McLAREN, L. C., y SYVERTON, J. T. 1959. Mammalian cell-virus relationship. III. Poliovirus production by non-primates cells exposed to poliovirus ribonucleic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 100, 843-45.
7. HULL, R. N., y TRITCH, J. 1962. Characterization of cell strains by viral susceptibility. *Nat. Cancer Inst. Monogr.*, 7, 161-69.
8. ROIZMAN, B. 1962. Polykaryocytosis. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 27, 327-42.
9. ROIZMAN, B., y AURELIAN, L. 1965. Abortive infection of canine cells by Herpes simplex virus. I. Characterization of viral progeny from cooperative infection with mutants differing in ability to multiply in canine cells. *J. Mol. Biol.*, 11, 528-38.
10. SHEIN, H. M., y ENDERS, J. F. 1962. Multiplication and cytopathogenicity of Simian Vacuolating virus 40 in cultures of human tissues. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 109, 495-500.
11. TANIGUCHI, S., y YOSHINO, K. 1964. An analysis of plaque assay of Herpes simplex virus in chick embryo monolayers. *Arch. Gesamte Virusforsch.*, 14, 537-52.

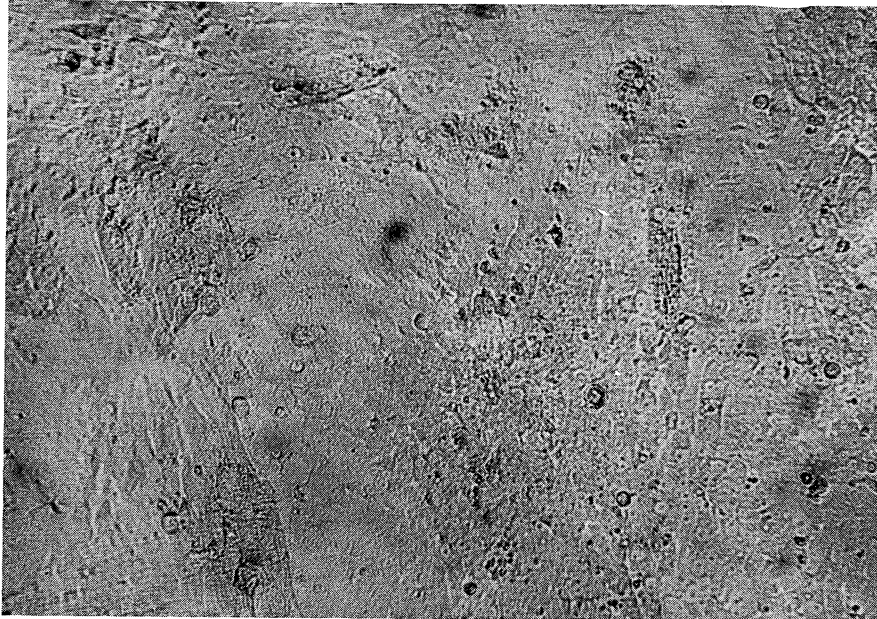


Figura 1. Aspecto normal del cultivo de la cepa "Ferrán", en monocapa. Tanto ésta como las restantes fotografías se han obtenido con material in vivo, sin teñir, con 96 aumentos

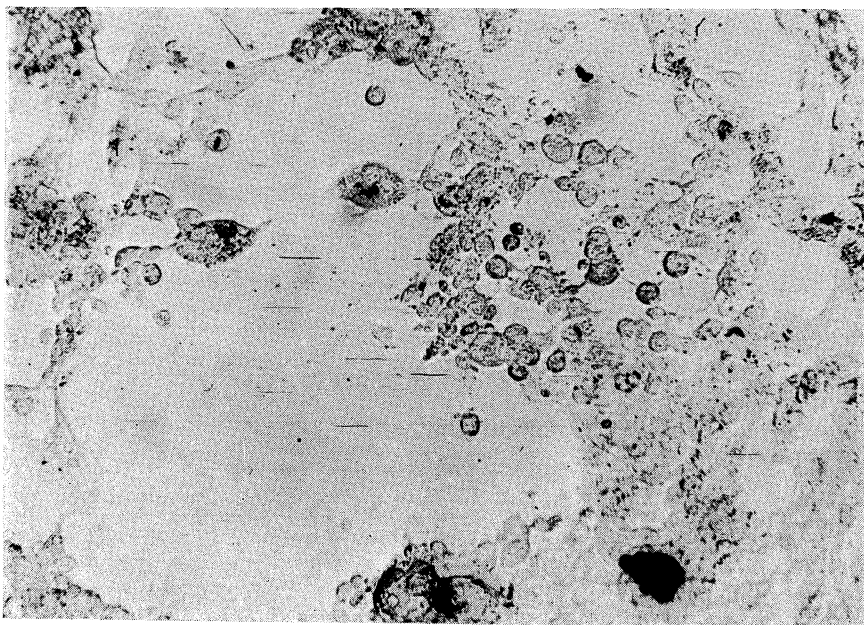


Figura 2. Células de la cepa "Ferrán", cuatro días después de haber sido inoculadas con neurovacuna. Puede observarse la formación de sincitios y prolongaciones citoplásmicas

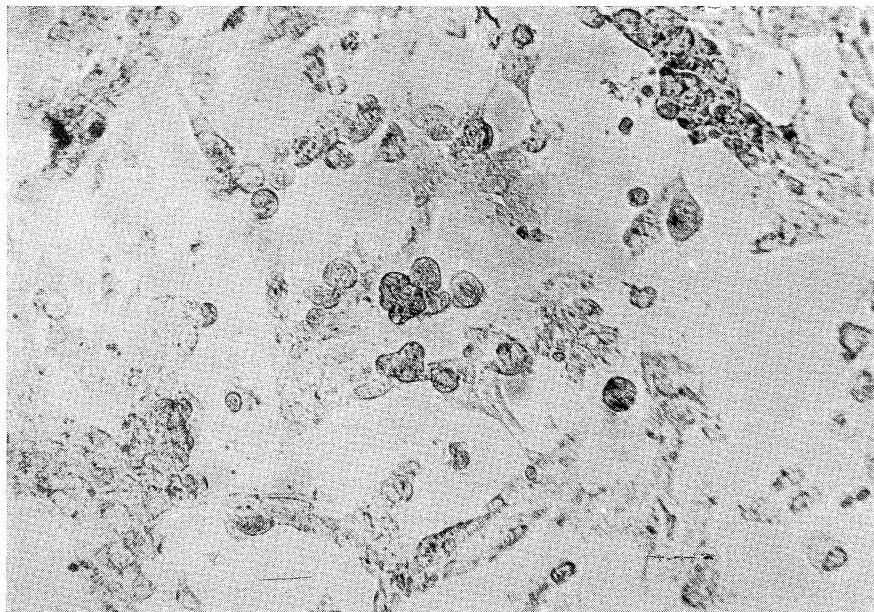


Figura 3. Células "Ferrán" inoculadas con virus herpes simplex, cepa LF, dieciséis horas después de la infección

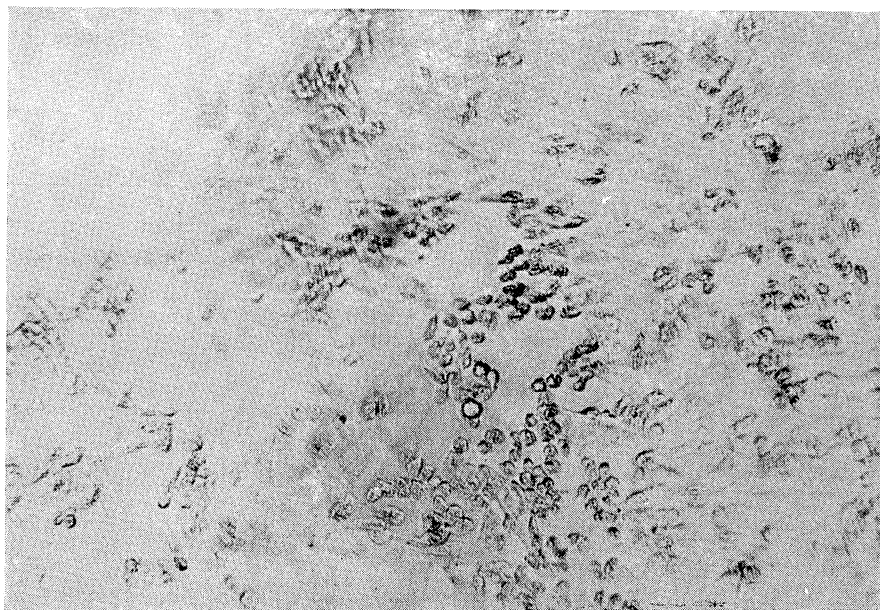


Figura 4. Microplaca formada por el virus de la peste porcina africana, siete días después de la infección del cultivo

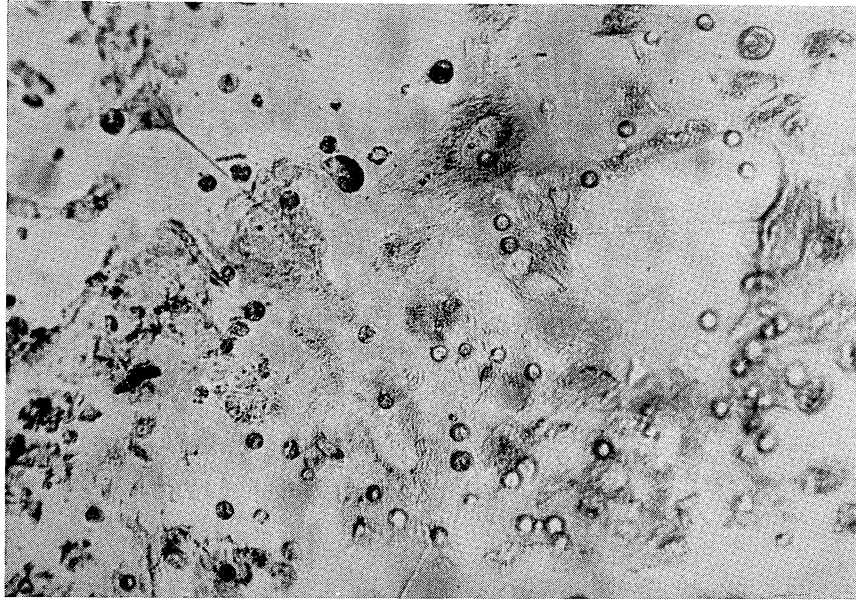


Figura 5. Efectos citopáticos del virus de la encefalitis equina Este, a las dieciséis horas de la inoculación del cultivo

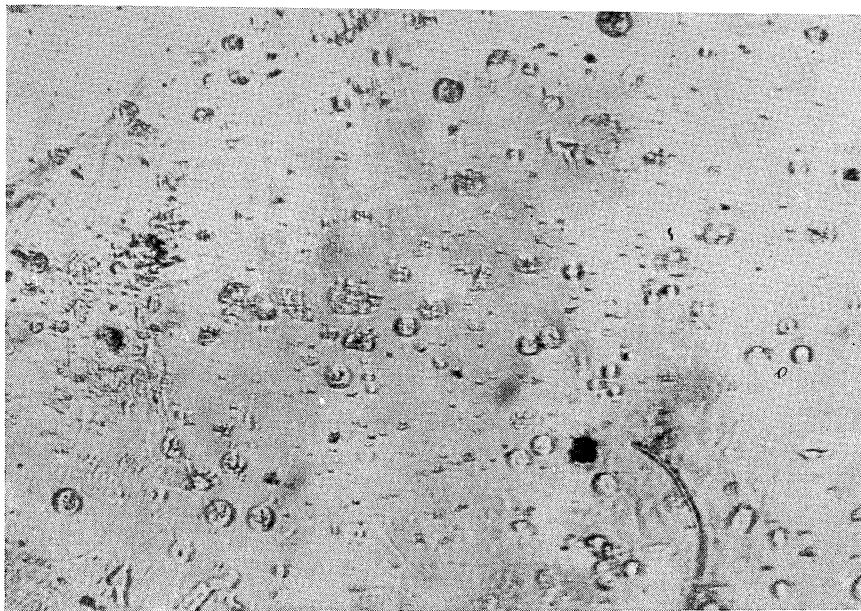


Figura 6. Aspecto del cultivo a los tres días de la inoculación con encefalitis equina Oeste

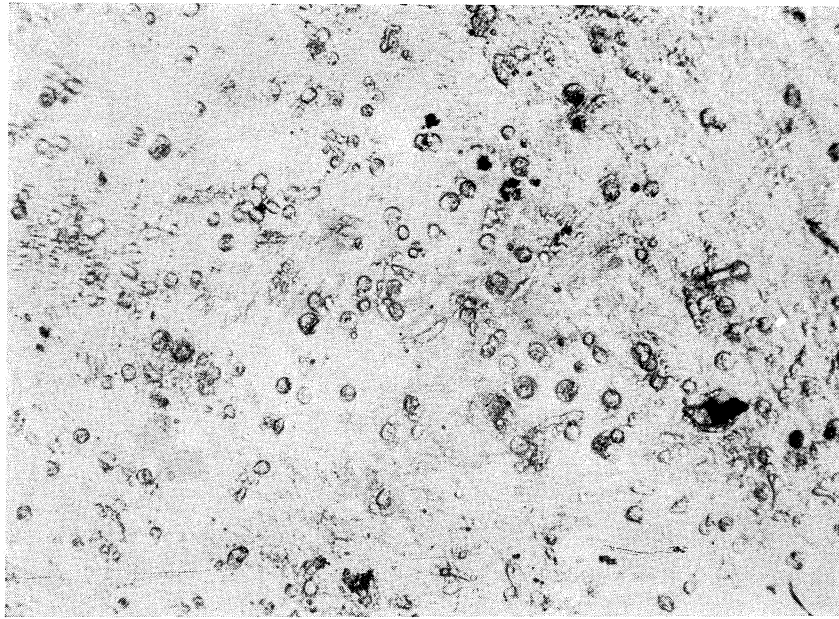


Figura 7. Células "Ferrán", dieciséis horas después de la inoculación del virus influenza Australia 57

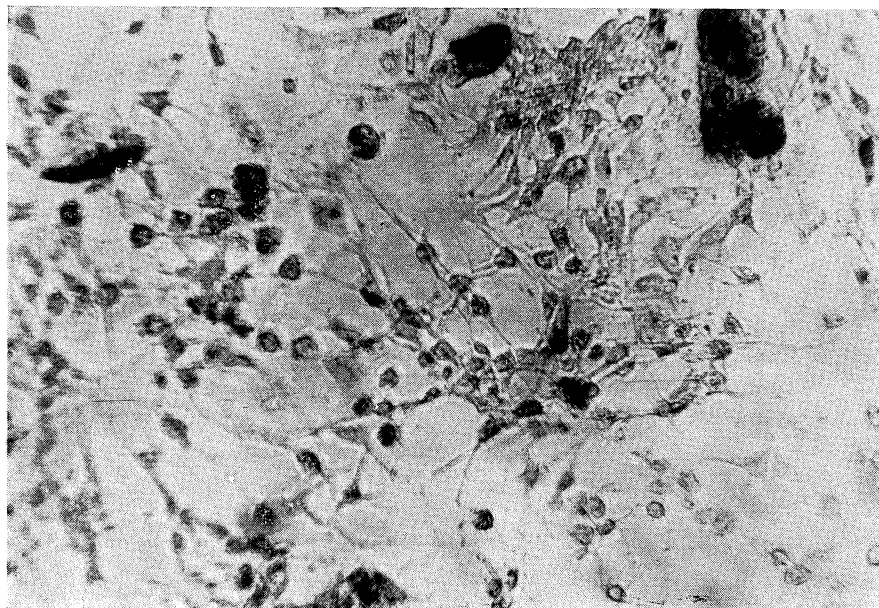


Figura 8. Cultivo inoculado con virus Sendai. Fotografía tomada a las veinticuatro horas de la inoculación

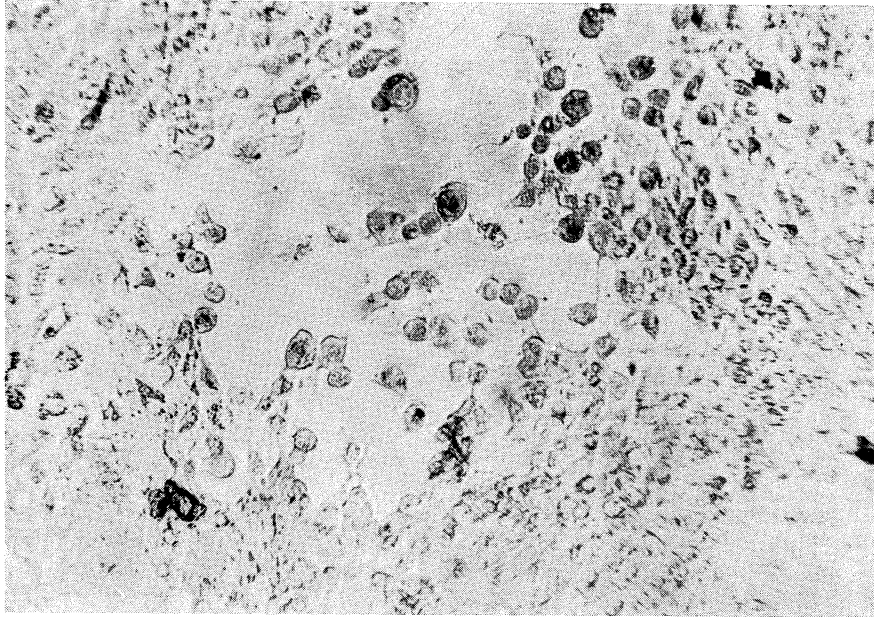


Figura 9. Microplaca producida por el virus Sindbis. Fotografía tomada cinco días después de la infección

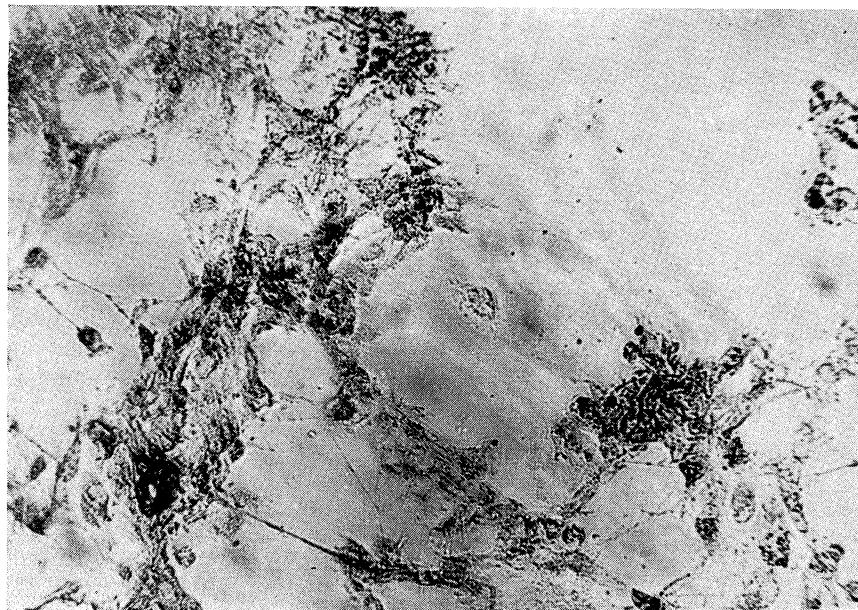


Figura 10. Aspecto de las células "Ferrán", seis días después de la inoculación con virus de la encefalitis japonesa B

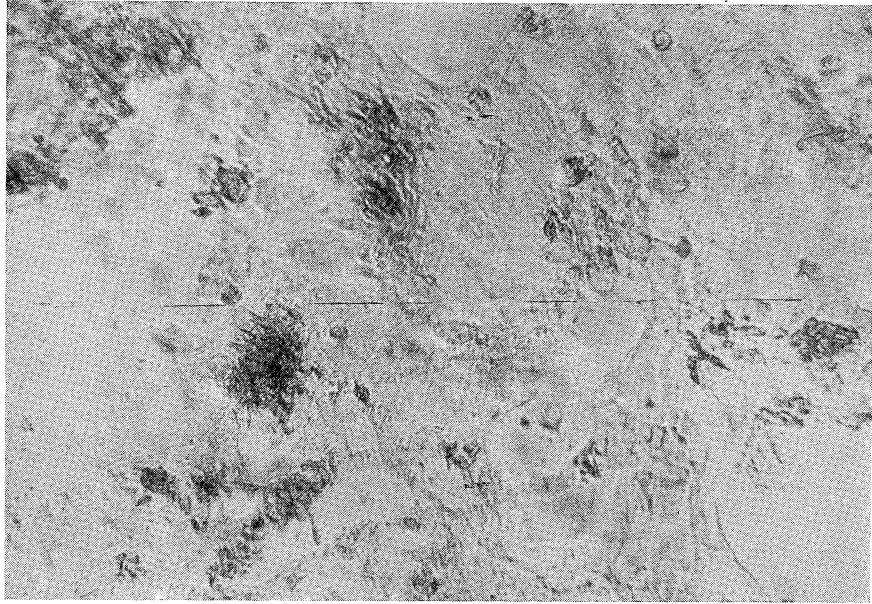


Figura 11. Efectos del virus de la encefalitis de San Luis, a las cuarenta y ocho horas de la inoculación

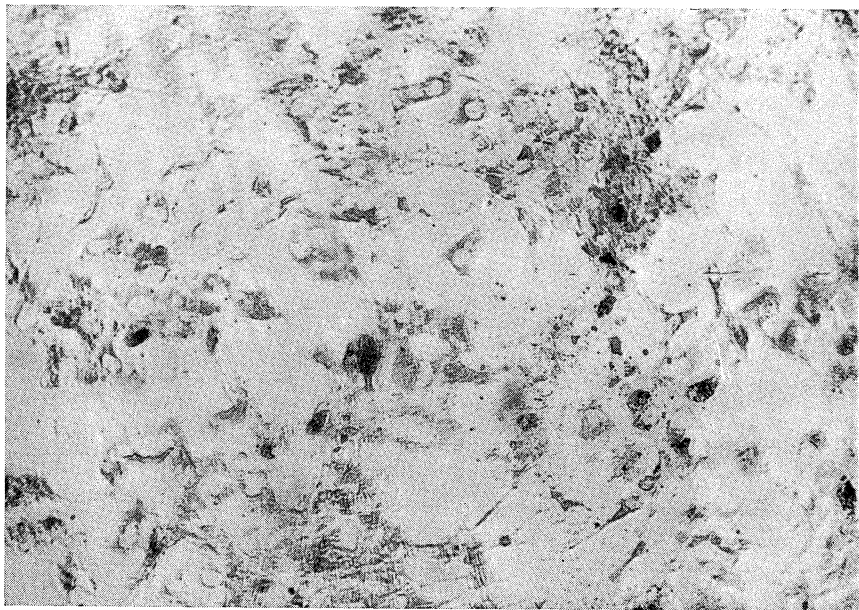


Figura 12. Degeneración del cultivo, a las dieciséis horas de infectado con el virus de la peste aviar clásica

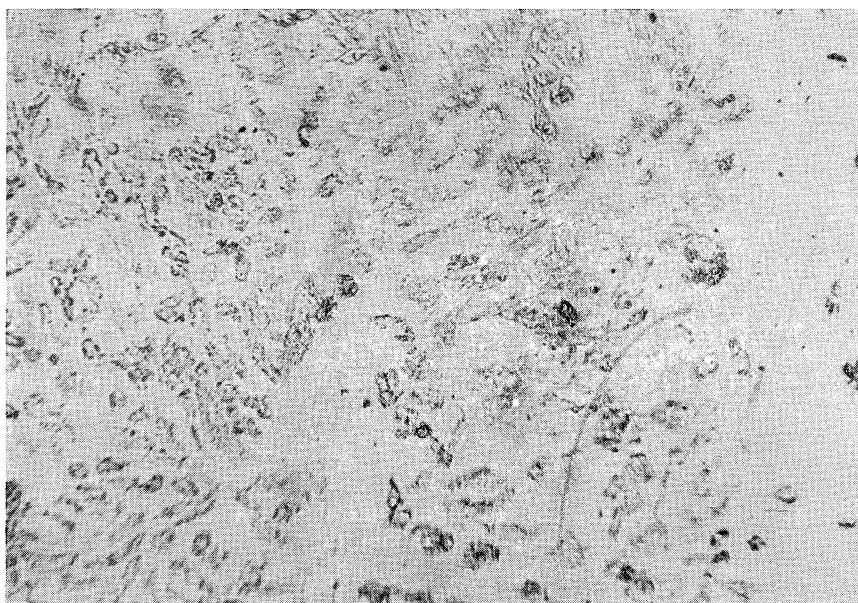


Figura 13. Células muy degeneradas, a las dieciséis horas de inocular el cultivo con virus de la pseudopeste aviar

Depósito legal: M. 702. - 1958.

ARTES GRÁF. REYES - Jerónima Llorente, 15. Madrid