
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la
Sociedad Española de Microbiología

VOLUMEN 37
NUMEROS 3-4
JULIO-DICIEMBRE, 1984



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS

Director

Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología y Bacteriología Experimental, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

«Microbiología Española» está citada en:

Biological Abstracts
Chemical Abstracts
Index Medicus
Pascal Explore
Referativny Zhurnal

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
28002 Madrid (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
28006 Madrid (España)

ISSN: 0026-2595

Depósito Legal M.702.-1958

CASTELLANA INDUSTRIAS GRAFICAS.—ALEJANDRO VILLEGAS, 25 - 28033-MADRID

I N D I C E

	<u>Página</u>
Sinergismo en la capacidad celulolítica <i>in vitro</i> de microorganismos aislados de la paja, <i>M. Mas</i> (*)	69
Actividad comparada <i>in vitro</i> de la ciprofloxacina (Bay O 9867), <i>E. Cantón, J. García, B. Vila, M. Santos</i> y <i>M. Gobernado</i> (**)	73
Estudio comparativo de cuatro métodos utilizados para la diferenciación de los géneros <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i> , <i>M.^a L. García, I. Menes</i> y <i>B. Moreno</i> (*)	81
Fenómenos nucleares y corticales durante la conjugación de <i>Glaucoma chattoni</i> (Ciliophora, Glaucomidae), <i>Ana Martín-González, Susana Serrano</i> y <i>D. Fernández-Galiano</i> (*)	89
Nuevas corrientes en el diseño de agentes antivíricos, <i>B. Alarcón</i> y <i>L. Carrasco</i> (*)	99

(*) En español. (**) En inglés.

I N D E X

	<u>Page</u>
Synergism in the <i>in vitro</i> cellulolytic capacity among microorganisms isolated from straw, <i>M. Mas</i> (*)	69
Ciprofloxacin (Bay O 9867). Comparative <i>in vitro</i> activity study, <i>E. Cantón, J. García, B. Vila, M. Santos</i> and <i>M. Gobernado</i> (**)	73
Comparative study of four procedures for separating Staphylococci from Micrococci, <i>M.^a L. García, I. Menes</i> and <i>B. Moreno</i> (*)	81
Nuclear and cortical events during the conjugation of <i>Glaucoma chattoni</i> (Ciliophora, Glaucomidae), <i>Ana Martín-González, Susana Serrano</i> and <i>D. Fernández-Galiano</i> (*)	89
New trends in the design of antiviral agents, <i>B. Alarcón</i> and <i>L. Carrasco</i> (*)	99

(*) In Spanish. (**) In English.

MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA

Editada por el Instituto de Microbiología "Jaime Ferrán" y la
Sociedad Española de Microbiología



VOLUMEN 37. 1984

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Director

Dr. Gonzalo Sierra, Director del Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Vicedirector

Dr. César Nombela, Presidente de la Sociedad Española de Microbiología.

Consejo de Redacción

Dra. Ramona Beltrá, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Gobernado, Servicio de Microbiología y Bacteriología Experimental, Ciudad Sanitaria de la Seguridad Social «La Fe», Valencia.

Dr. Carlos Hardisson, Departamento Interfacultativo de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Dr. Juan Francisco Martín, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de León.

Dra. Fuensanta Reyes, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Dr. Miguel Rubio, Instituto de Microbiología «Jaime Ferrán», CSIC.

Secretario de Redacción

Dr. Luis Sánchez.

«Microbiología Española» está citada en:

Biological Abstracts
Chemical Abstracts
Index Medicus
Pascal Explore
Referativny Zhurnal

Redacción

«Microbiología Española»
Joaquín Costa, 32
28002 Madrid (España)

Suscripciones

Administración y Distribución
del Servicio de Publicaciones del CSIC
Vitrubio, 8
28006 Madrid (España)

I N D I C E

	Página
<i>Alarcón, B., y Carrasco, L.: Nuevas corrientes en el diseño de agentes antivíricos (*)</i>	99
<i>Alvarez-Batista, M. A., y García-Maíquez, E.: Componentes aromáticos de la fermentación alcohólica del Jerez (*)</i>	39
<i>Alvarez de Cienfuegos, G.: véase Ruiz, C.</i>	47
<i>Arias, M. E.: véase Soliveri, J.</i>	17
<i>Arias, M. E.: véase Lapeña, M. A.</i>	27
<i>Ascaso, C.: véase Bermúdez de Castro, F.</i>	9
<i>Bermúdez de Castro, F.; Yuste, P.; y Ascaso, C.: Morfología del endófito de la inoculación cruzada <i>Elaeagnus angustifolia</i> × <i>Alnus glutinosa</i> (*)</i>	9
<i>Cantón, E.; García, J.; Vila, B.; Santos, M., y Gobernado, M.: Actividad comparada <i>in vitro</i> de la ciprofloxacina (Bay O 9867) (**)</i>	73
<i>Carrasco, L.: véase Alarcón, B.</i>	99
<i>Casal, J.: véase Martín-Bourgon, C.</i>	55
<i>Fernández-Galiano, D.: véase Martín-González, Ana</i>	89
<i>García, J.: véase Cantón, E.</i>	73
<i>García, M.ª L.; Menes, I., y Moreno, B.: Estudio comparativo de cuatro métodos utilizados para la diferenciación de los géneros <i>Staphylococcus</i> y <i>Micrococcus</i> (*)</i>	81
<i>García-Maíquez, E.: véase Alvarez-Batista, M. A.</i>	39
<i>Gobernado, M.: véase Cantón, E.</i>	73
<i>Hardisson, C.: véase Méndez, F. J.</i>	1
<i>Laborda, F.: véase Soliveri, J.</i>	17
<i>Laborda, F.: véase Lapeña, M. A.</i>	27
<i>Lapeña, M. A.; Arias, M. E., y Laborda, F.: Estudio e identificación de microorganismos en el río Henares (*)</i>	27
<i>Llaneza, J.: véase Méndez, F. J.</i>	1
<i>Martín-Bourgon, C.; Sáez, J. A., y Casal, J.: Efecto de las bacterias orofaríngeas sobre el cre- cimiento <i>in vitro</i> de <i>Mycoplasma orale</i> (**)</i>	55
<i>Martín-González, Ana; Serrano, Susana, y Fernández-Galiano, D.: Fenómenos nucleares y corticales durante la conjugación de <i>Glaucoma chattoni</i> (Ciliophora, Glaucomidae) (*)</i>	89
<i>Mas, M.: Sinergismo en la capacidad celulolítica <i>in vitro</i> de microorganismos aislados de la paja (*)</i>	69
<i>Méndez, F. J.; Mendoza, M.ª Carmen; Llaneza, J., y Hardisson, C.: Plásmidos-R albergados en cepas nosocomiales de <i>Serratia marcescens</i>: espectro de huésped y estabilidad (**)</i>	1
<i>Mendoza, M.ª Carmen: véase Méndez, F. J.</i>	1
<i>Menes, I.: véase García, M.ª L.</i>	81
<i>Moreno, B.: véase García, M.ª L.</i>	81

	Página
<i>Ramos-Cormenzana, A.:</i> véase <i>Ruiz, C.</i>	47
<i>Ramos-Cormenzana, A.:</i> véase <i>Sierra, Gonzalo</i>	65
<i>Ruiz, C.; Alvarez de Cienfuegos, G.; Ramos-Cormenzana, A., y Ruiz-Bravo, A.:</i> Actividad inmunomoduladora en el género <i>Myxococcus</i> (*)	47
<i>Ruiz-Bravo, A.:</i> véase <i>Ruiz, C.</i>	47
<i>Sáez, J. A.:</i> véase <i>Martín-Bourgon, C.</i>	55
<i>Santos, M.:</i> véase <i>Cantón, E.</i>	73
<i>Serrano, Susana:</i> véase <i>Martín-González, Ana</i>	89
<i>Sierra, Gonzalo, y Ramos-Cormenzana, A.:</i> Libros recibidos (*)	65
<i>Soliveri, J.; Arias, M. E., y Laborda, F.:</i> Estudio de bacterias halófilas extremas aisladas de hábitats salinos no litorales (*)	17
<i>Vila, B.:</i> véase <i>Cantón, E.</i>	73
<i>Yuste, P.:</i> véase <i>Bermúdez de Castro, F.</i>	9

(*) En español. (**) En inglés.

I N D E X

	Page
<i>Alarcón, B., and Carrasco, L.</i> : New trends in the design of antiviral agents (*).....	99
<i>Alvarez-Batista, M. A., and García-Maíquez, E.</i> : Aromatic components in the alcoholic fermentation of Sherry wine (*)	39
<i>Alvarez de Cienfuegos, G.</i> : see <i>Ruiz, C.</i>	47
<i>Arias, M. E.</i> : see <i>Soliveri, J.</i>	17
<i>Arias, M. E.</i> : see <i>Lapeña, M. A.</i>	27
<i>Ascaso, C.</i> : see <i>Bermúdez de Castro, F.</i>	9
<i>Bermúdez de Castro, F.; Yuste, P.; and Ascaso, C.</i> : Endophyte morphology of the cross-inoculation <i>Elaeagnus angustifolia</i> × <i>Alnus glutinosa</i> (*).....	9
<i>Cantón, E.; García, J.; Vila, B.; Santos, M., and Gobernado, M.</i> : Ciprofloxacin (Bay O 9867). Comparative <i>in vitro</i> activity study (**)	73
<i>Carrasco, L.</i> : see <i>Alarcón, B.</i>	99
<i>Casal, J.</i> : see <i>Martín-Bourgon, C.</i>	55
<i>Fernández-Galiano, D.</i> : see <i>Martín-González, Ana</i>	89
<i>García, J.</i> : see <i>Cantón, E.</i>	73
<i>García, M.^a L.; Menes, I., and Moreno, B.</i> : Comparative study of four procedures for separating <i>Staphylococci</i> from <i>Micrococci</i> (*)	81
<i>García-Maíquez, E.</i> : see <i>Alvarez-Batista, M. A.</i>	39
<i>Gobernado, M.</i> : see <i>Cantón, E.</i>	73
<i>Hardisson, C.</i> : see <i>Méndez, F. J.</i>	1
<i>Laborda, F.</i> : see <i>Soliveri, J.</i>	17
<i>Laborda, F.</i> : see <i>Lapeña, M. A.</i>	27
<i>Lapeña, M.A.; Arias, M.E., and Laborda, F.</i> : Study and identification of microorganisms in the Henares river (*)	27
<i>Llaneza, J.</i> : see <i>Méndez, F. J.</i>	1
<i>Martín-Bourgon, C.; Sáez, J.A., and Casal, J.</i> : Effect of oral bacteria on the <i>in vitro</i> growth of <i>Mycoplasma orale</i> (**)	55
<i>Martín-González, Ana; Serrano, Susana, and Fernández-Galiano, D.</i> : Nuclear and cortical events during the conjugation of <i>Glaucoma chattoni</i> (Ciliophora, Glaucomidae) (*)	89
<i>Mas, M.</i> : Synergism in the <i>in vitro</i> cellulolytic capacity among microorganisms isolated from straw (*)	69
<i>Méndez, F. J.; Mendoza, M.^a Carmen; Llaneza, J., and Hardisson, C.</i> : R-plasmids carried by nosocomial strains of <i>Serratia marcescens</i> : host range and stability (**)	1
<i>Mendoza, M.^a Carmen</i> : see <i>Méndez, F. J.</i>	1
<i>Menes, I.</i> : see <i>García, M.^a L.</i>	81
<i>Moreno, B.</i> : see <i>García, M.^a L.</i>	81

	Page.
<i>Ramos-Cormenzana, A.: see Ruiz, C.</i>	47
<i>Ramos-Cormenzana, A.: see Sierra, Gonzalo</i>	65
<i>Ruiz, C.; Alvarez de Cienfuegos, G.; Ramos-Cormenzana, A., and Ruiz-Bravo, A.: Immuno-</i> <i>modulation by the genus Myxococcus (*)</i>	47
<i>Ruiz-Bravo, A.: see Ruiz, C.</i>	47
<i>Sáez, J. A.: see Martín-Bourgon, C.</i>	55
<i>Santos, M.: see Cantón, E.</i>	73
<i>Serrano, Susana: see Martín-González, Ana</i>	89
<i>Sierra, Gonzalo, and Ramos-Cormenzana, A.: Received books (*)</i>	65
<i>Soliveri, J.; Arias, M. E., and Laborda, F.: Study of extreme halophilic bacteria isolated from</i> <i>non-litoral salty habitats (*)</i>	17
<i>Vila, B.: see Cantón, E.</i>	73
<i>Yuste, P.: see Bermúdez de Castro, F.</i>	9

(*) In Spanish. (**) In English.

SINERGISMO EN LA CAPACIDAD CELULOLITICA *IN VITRO* DE MICROORGANISMOS AISLADOS DE LA PAJA

M. MAS

Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, Badajoz

(Aceptado: 20 de septiembre de 1984)

RESUMEN

Con el fin de optimizar la degradación de residuos ricos en celulosa, se ha analizado la actividad celulolítica de microorganismos aislados de la paja, tanto en cultivos puros como en cultivos mixtos.

Los cultivos mixtos alcanzaban, generalmente, una actividad celulolítica mayor que los cultivos puros. Sin embargo, las poblaciones mixtas naturales, a partir de las cuales se hicieron los aislamientos, alcanzaban una actividad celulolítica mucho mayor que los cultivos puros o mixtos.

SUMMARY

To optimize degradation of cellulosic wastes, cellulolytic activity of microorganisms isolated from straw, have been studied, both in pure and in mixed cultures.

Mixed cultures reached generally a cellulolytic activity higher than pure cultures. However, natural mixed populations, from which isolations were made, reached a cellulolytic activity very much higher than pure or mixed cultures.

INTRODUCCIÓN

En el aprovechamiento de los residuos agrícolas e industriales, ricos en celulosa, el factor limitante

suele ser la hidrólisis de este polisacárido (5). La mayor parte de la descomposición de la celulosa, en la Naturaleza, se debe a la actividad enzimática de microorganismos.

mos. Sin embargo, estos microorganismos celulolíticos suelen tener un bajo rendimiento en la eficacia de producción y actividad de celulasas (2). Aunque hay mutantes superproductores de celulasas, necesitan condiciones especiales de crecimiento, pudiendo no adaptarse a ambientes determinados.

Los objetivos pretendidos en este trabajo han sido aislar de los propios residuos microorganismos de fácil inoculación y con buena capacidad celulolítica extracelular, ya sea actuando solos o bien por sinergismo en cultivos mixtos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de microorganismos

Diferentes muestras de paja se incubaron en una solución de sales minerales, con 0,1 % de extracto de levadura y una tira de papel de filtro. La solución de sales minerales contenía en porcentajes: NaCl, 0,6; (NH₄)₂SO₄, 0,1; KH₂PO₄, 0,05; K₂HPO₄, 0,05; MgSO₄, 0,01 y CaCl₂, 0,01 (1). El aislamiento de cepas puras se realizó en el mismo medio, con carboxi-metil-celulosa al 0,5 % y agar al 2 %.

Cada cepa pura aislada se inoculó en 2 ml del medio líquido, en tubos de ensayo, con papel de filtro en un caso y algodón (celulosa cristalina) en otro. Los tubos de ensayo se incubaron, sin agitación, a 25 °C. Las cepas capaces de degradar, en 8 d, tanto el papel de filtro como el algodón, se seleccionaron para el análisis cuantitativo de la actividad celulolítica.

Medida de la actividad celulolítica

La actividad celulolítica extracelular se midió como la cantidad de

azúcares reductores producida por 0,5 ml del sobrenadante del cultivo, con 1 ml de tampón (citrato sódico 0,05 M pH 4,8), incubado con 50 mg de papel de filtro Whatman núm. 1, durante 1 h, a 50 °C. La reacción se paraba con 3 ml de ácido dinitrosalicílico (3-4).

RESULTADOS

Selección de microorganismos con actividad celulolítica

De un conjunto de microorganismos aislados de la paja, se han seleccionado 8 cepas bacterianas con capacidad celulolítica extracelular en el crecimiento, tanto en papel de filtro como en algodón.

Las cepas seleccionadas pertenecen a tres poblaciones mixtas naturales, resultantes de la incubación directa de paja en medio líquido.

Estudio comparativo de la actividad celulolítica

La evolución de la actividad celulolítica de los cultivos se ha expresado como microgramos de glucosa detectada por 10 ml de cultivo.

La *tabla 1* muestra la actividad enzimática desarrollada por la población mixta natural 13/1, así como por los cultivos puros C4 y

Tabla 1. Actividad celulolítica detectada en el cultivo original 13/1 y en los aislados de él. Actividad expresada en microgramos de glucosa producidos por 10 ml de cultivo, durante 1 h

Cultivo	Tiempo de incubación		
	10 d	15 d	20 d
13/1	42	59	119
C4	12	37	0
C5	5	5	0
C4 + C5	8	63	0

C5 aislados de ella, y por el cultivo mixto constituido por la mezcla C4 + C5.

La *tabla 2* corresponde a la actividad celulolítica de la población mixta natural 15/3, de los cultivos puros C1 y C2 aislados de ella, y del cultivo mixto formado por la mezcla de los cultivos C1 y C2.

Tabla 2. Actividad celulolítica detectada en el cultivo original 15/3 y en los aislados de él. Actividad expresada en microgramos de glucosa producidos por 10 ml de cultivo, durante 1 h

Cultivo	Tiempo de incubación		
	10 d	15 d	20 d
15/3	73	106	238
C1	95	37	1
C2	86	34	0
C1 + C2	4	84	6

En la *tabla 3* están representadas las actividades enzimáticas de las poblaciones siguientes: mixta natural 15/3, cultivos puros C6 y C7 aislados de ella, y población mixta constituida por C6 + C7.

Tabla 3. Actividad celulolítica detectada en el cultivo original 15/3 y en los aislados de él. Actividad expresada en microgramos de glucosa producidos por 10 ml de cultivo, durante 1 h

Cultivo	Tiempo de incubación		
	10 d	15 d	20 d
15/3	73	106	238
C6	28	0	25
C7	5	5	0
C6 + C7	24	57	0

Por último, la *tabla 4* recoge la actividad celulolítica extracelular de la población mixta natural 28/5, de los cultivos puros aislados de ella C8 y C9, y de la población mixta C8 + C9.

Tabla 4. Actividad celulolítica detectada en el cultivo original 28/5 y en los aislados de él. Actividad expresada en microgramos de glucosa producidos por 10 ml de cultivo, durante 1 h

Cultivo	Tiempo de incubación		
	10 d	15 d	20 d
28/5	83	144	259
C8	12	31	34
C9	32	23	20
C8 + C9	24	42	34

DISCUSIÓN

En general, las poblaciones mixtas alcanzaban una actividad celulolítica superior a la de los cultivos puros que las componen, lo que parece indicar la existencia de sinergismo entre las cepas que forman cada población mixta (6-7).

Sin embargo, las poblaciones mixtas naturales, a partir de las cuales se hicieron los aislamientos, poseían una actividad celulolítica muy superior a la de los cultivos puros o mixtos, que podía ser debida a la acción combinada con otras bacterias presentes en la población mixta natural, y también a la existencia de hongos y protozoos con posible actividad celulolítica.

Las poblaciones mixtas naturales, al contrario de lo que ocurría con los cultivos puros y mixtos, mantenían e incrementaban la actividad celulolítica con el tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. CALLIHAN, C. D. and SRINIVASAN, V. R. 1973. Comestible, digestible protein from cellulose. U.S. Pat. Off., 3, 761, 355.

2. GUPTA, J. K.; KUMAR, L.; VADEHRA, D. V. and GUPTA, Y. P. 1976. Microbial protein from cellulosic wastes. J. Sci. Ind. Res., 35, 325-27.
3. MANDELS, M.; ANDREOTTI, R. and ROCHE, C. 1976. Measurement of saccharifying cellulase. Biotechnol. Bioeng. Symp., 6, 21-33.
4. PEITERSEN, N. 1975. Production of cellulase and protein from barley straw by *Trichoderma viride*. Biotechnol. Bioeng., 17, 361-374.
5. SRINIVASAN, V. R. and CALLIHAN, C. D. 1971. Nutritive protein from cellulose. U. S. Pat. Off., 3, 627, 095.
6. WOOD, T. M. 1980. Enzymes and mechanisms involved in the solubilization of native cellulose. Cienc. Biol.: 5, 27-33.

CIPROFLOXACIN (BAY O 9867). COMPARATIVE *IN VITRO* ACTIVITY STUDY

E. CANTON, J. GARCIA, B. VILA, M. SANTOS and M. GOBERNADO

Servicio de Microbiología y Unidad de Bacteriología Experimental, Centro de Investigación, Hospital «La Fe», Valencia.

(Aceptado: 16 de octubre de 1984)

SUMMARY

The *in vitro* activity of ciprofloxacin (BAY O 9867) against 718 aerobic gramnegative and grampositive clinical isolates was compared with that of norfloxacin, pipemidic acid and nitrofurantoin. Ciprofloxacin was highly active against most of the bacterial strains tested with MIC's ranging from 0.007 to 4 mg/l. All strains of *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*, *Morganella* and *Klebsiella* were inhibited with a concentration equal to or less than 0.25 mg/l. *Staphylococcus* and *Streptococcus faecalis* were less sensitive, 100 % of the strains were inhibited with 1 mg/l. *Acinetobacter* and *Serratia* had a MIC₉₀ of 1 mg/l. Ciprofloxacin was the most active compound tested. It showed similar activity to norfloxacin against *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* (MIC₉₀ from 0.06 to 1 mg/l). Pipemidic acid was more active than nitrofurantoin against Enterobacteriaceae, but both compounds were less active than ciprofloxacin and norfloxacin.

RESUMEN

Se ha comprobado la actividad *in vitro* de la ciprofloxacina (BAY O 9867) sobre 718 cepas bacterianas, comparándola con la norfloxacina, ácido pipemídico y nitrofurantoína. La ciprofloxacina fue muy activa contra la mayoría de las cepas ensayadas. El 100 % de las bacterias se inhibieron con concentraciones que oscilaron entre 0,007-4 mg/l. La ciprofloxacina fue muy activa contra *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*,

Morganella y *Klebsiella*, CIMs iguales o inferiores a 0,25 mg/l para el 100% de las cepas. *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* fueron menos sensibles, sin embargo el 100% de las cepas se inhibieron con 1 mg/l. La CIM 90 para *Acinetobacter* y *Serratia* fue de 1 mg/l. Ciprofloxacina y norfloxacina mostraron similar actividad frente a *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus*, CIM 90 entre 0,06 y 1 mg/l. Sobre el resto de los microorganismos ensayados la ciprofloxacina mostró mayor actividad. La actividad del ácido pipemídico fue superior a la nitrofurantoina en las Enterobacteriaceas, pero ambos tuvieron una actividad muy inferior a la ciprofloxacina y norfloxacina.

INTRODUCTION

Ciprofloxacin (BAY O 9867) is a new chemotherapeutic agent analog of nalidixic acid with a greater antimicrobial activity. Ciprofloxacin was found to have a broad antimicrobial spectrum against both grampositive and gramnegative bacteria (2). It is specially interesting because of its activity against strains of *Enterobacter*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, including some which were found to be resistant to the third generation cephalosporins. In this study the *in vitro* activity of ciprofloxacin against grampositive and gramnegative aerobic bacteria was tested and compared with the activity of two quinoleic derivatives that have recently appeared, norfloxacin (6-7) and pipemidic acid (10), and nitrofurantoin an agent that has shown to be useful for treatment of urinary tract infection (1).

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains

A total of 718 recent aerobic clinical isolates were studied. These

included: 72 *Escherichia coli*, 37 *Enterobacter* spp., 41 *Klebsiella* spp., 72 *Serratia marcescens*, 42 *Citrobacter freundii*, 25 *Providencia* spp., 30 *Proteus vulgaris*, 20 *P. mirabilis*, 32 *Morganella morganii*, 20 *Pseudomonas aeruginosa*, 61 *Acinetobacter calcoaceticus*, 57 *Salmonella* spp., 37 *Shigella* spp., 58 *Streptococcus faecalis*, 50 *Staphylococcus aureus*, and 41 *Staphylococcus epidermidis*. The grampositive cocci were identified by standard procedures (4,8), the Enterobacteriaceae were identified by the API 20E method (APY SYSTEM, S.A.), and the glucose non-fermenting bacteria by the oxi/ferm tube method (Roche). *Es. coli* ATCC 25922, *En. aerogenes* ATCC 13048, *En. cloacae* ATCC 13047, *Ac. calcoaceticus* ATCC 19606, *Ps. aeruginosa* ATCC 9721, *Sta. aureus* ATCC 25923, *Sta. epidermidis* ATCC 12228 and *Str. faecalis* ATCC 19433 were included as reference strains.

Antibacterial agents

The standard dry powder substances, of known potency tested were: ciprofloxacin (Química far-

maceutica Bayer, S.A.), norfloxacin (Merck Sharp and Dohme de España, S.A.), pipemidic acid (Laboratorios Almirall) and nitrofurantoin (Laboratories Uriach). The stock solutions of the antibacterial agents were made in accordance with the instructions guide of the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (13).

Antimicrobial susceptibility test

Antimicrobial susceptibility test were measured by an agar dilution method with Mueller-Hinton agar. A final inoculum of 10^4 CFU's, prepared by dilution of a fresh overnight broth culture, was applied to agar with a Steer's replicator. Agar plates were incubated at 37 °C for 18 h.

RESULTS

Ciprofloxacin showed excellent activity against the majority of bacteria tested (table 1). A hundred

per cent of *Klebsiella* spp. were inhibited by 0.25 mg/l. *Proteus vulgaris* required concentrations of 0.12 mg/l to inhibit 100% of isolates, and *Morganella morganii* and *P. mirabilis* required concentrations of 0.015 mg/l to inhibit 100% of isolates. *Salmonella* and *Shigella* were also very sensitive, 0.007 mg/l inhibited 100% *Shigella* isolates and 91.33% of *Salmonella* isolates and 100% of them with 0.03 mg/l. *Serratia* and *Acinetobacter* were less sensitive, 100% of the strains tested were inhibited with 4 mg/l. Ciprofloxacin showed good activity against grampositive cocci concentrations of 0.5 mg/l inhibited 100% of *Staphylococcus aureus*, *Sta. epidermidis* and 5% of *Streptococcus faecalis*.

The comparative activity of ciprofloxacin with that of norfloxacin, pipemidic acid and nitrofurantoin is shown table 2. Ciprofloxacin and norfloxacin were very active against the majority of orga-

Table 1. In vitro activity of ciprofloxacin

Organism n. ^o of strains	Range	Concentration (mg/l) required to inhibit the following percentages of isolates		
		50	75	90
<i>Escherichia coli</i> (72)	<.007 - 1	.007	.015	.06
<i>Enterobacter</i> spp (37)	<.007 - 1	.015	.06	.25
<i>Klebsiella</i> spp (41)	.015 - .25	.015	.015	.03
<i>Serratia marcescens</i> (72)	.015 - 4	.015	.25	.5
<i>Citrobacter freundii</i> (42)	<.007 - 1	<.007	.007	.03
<i>Providencia</i> spp (25)	<.007 - 1	.03	.12	.5
<i>Proteus vulgaris</i> (30)	.007 - .12	.03	.05	.06
<i>Morganella morganii</i> (32)	<.007 - .015	<.007	.007	.015
<i>P. mirabilis</i> (20)	.007 - .015	.007	.012	.015
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)	.03 - 1	.1	.12	.5
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (61)	.06 - 4	.25	.5	1
<i>Salmonella</i> spp (57)	<.007 - .03	<.007	<.007	.007
<i>Shigella</i> spp (37)	<.007 - .007	<.007	<.007	.007
<i>Streptococcus faecalis</i> (58)	.5 - 2	1	1	1
<i>Staphylococcus aureus</i> (50)	.12 - .5	.1	.25	.3
<i>Sta. epidermidis</i> (41)	.06 - .5	.12	.2	.25

Table 2. Comparative antibacterial activity of ciprofloxacin and other antimicrobial agents.

Organism (n.º tested)	Antimicrobial agent	Range	Concentration (mg/l) required to inhibit the following percentages of isolates		
			50	75	90
<i>Escherichia coli</i> (72)	Ciprofloxacin	<.007 - 1	.007	.015	.06
	Norfloxacin	.007 - 2	.1	.12	.3
	Pipemedic acid	2 - 32	3.1	4	6.2
	Nitrofurantoin	.5 - >256	8	16	32
<i>Enterobacter</i> spp (37)	Ciprofloxacin	<.007 - 1	.15	.06	.25
	Norfloxacin	.007 - 8	.12	.25	.5
	Pipemidic acid	2 - 64	4	8	64
	Nitrofurantoin	1 - >256	32	32	256
<i>Klebsiella</i> spp (41)	Ciprofloxacin	.015 - .25	.015	.015	.03
	Norfloxacin	.03 - 1	.05	.07	.12
	Pipemidic acid	2 - 64	1.5	4	8
	Nitrofurantoin	4 - 64	12	16	32
<i>Serratia marcescens</i> (72)	Ciprofloxacin	.015 - 4	.015	.25	.5
	Norfloxacin	.06 - 8	.12	.5	1
	Pipemidic acid	2 - 32	3.1	6.2	12
	Nitrofurantoin	32 - >256	128	> 256	> 256
<i>Citrobacter freundii</i> (42)	Ciprofloxacin	<.007 - 1	<.007	.007	.03
	Norfloxacin	.003 - 2	.05	.12	.25
	Pipemidic acid	1 - 64	3.1	4	8
	Nitrofurantoin	1 - >256	12.5	16	32
<i>Providencia</i> spp (25)	Ciprofloxacin	<.007 - 1	.03	.12	.5
	Norfloxacin	.015 - 4	.05	.12	1.5
	Pipemidic acid	2 - 64	3.1	6.2	16
	Nitrofurantoin	1 - >256	32	64	256
<i>Proteus vulgaris</i> (30)	Ciprofloxacin	.007 - .12	.03	.05	.06
	Norfloxacin	.03 - .12	.03	.05	.06
	Pipemidic acid	2 - 16	3.1	3.1	6.2
	Nitrofurantoin	8 - 64	32	64	64
<i>P. mirabilis</i> (20)	Ciprofloxacin	.007 - .015	.007	.01	.015
	Norfloxacin	.007 - .25	.007	.007	.03
	Pipemidic acid	2 - 16	6.2	8	12.5
	Nitrofurantoin	1 - >256	32	64	128

(Continued)

(Continued)

Organism (n.º tested)	Antimicrobial agent	Range	Concentration (mg/l) required to inhibit the following percentages of isolates		
			50	75	90
<i>Morganella morganii</i> (30)	Ciprofloxacin	<.007 - .015	<.007	.007	.01
	Norfloxacin	.03 - .25	.03	.05	.06
	Pipemidic acid	2 - 16	2	3.1	4
	Nitrofurantoin	16 - 64	25	32	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (20)	Ciprofloxacin	.03 - 1	.1	.12	.5
	Norfloxacin	.25 - 2	.25	.5	1
	Pipemidic acid	8 - 64	16	16	50
	Nitrofurantoin	> 256	> 256	> 256	> 256
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> (61)	Ciprofloxacin	.06 - 4	.25	.5	1
	Norfloxacin	.5 - 16	4	6.2	8
	Pipemidic acid	> 64	> 64	> 64	> 64
	Nitrofurantoin	256	256	256	256
<i>Salmonella</i> spp (57)	Ciprofloxacin	<.007 - .03	<.007 -	<.007	.007
	Norfloxacin	.015 - .12	.02	.03	.06
	Pipemidic acid	.5 - 16	1	1.5	3.1
	Nitrofurantoin	.5 - 64	8	12	16
<i>Shigella</i> spp (57)	Ciprofloxacin	<.007 - .007	<.007	<.007	<.007
	Norfloxacin	.007 - .03	.007	.007	.015
	Pipemidic acid	2 - 4	2	2	2
	Nitrofurantoin	2 - 4	2	2	4
<i>Streptococcus faecalis</i> (58)	Ciprofloxacin	.5 - 2	1	1	1
	Norfloxacin	1 - 8	2	3.2	4
	Pipemidic acid	> 64	> 64	> 64	> 64
	Nitrofurantoin	2 - 16	3.2	6.2	8
<i>Staphylococcus aureus</i> (50)	Ciprofloxacin	.12 - .5	.1	.25	.3
	Norfloxacin	.25 - 2	.5	.7	1
	Pipemidic acid	16 - > 64	> 64	> 64	> 64
	Nitrofurantoin	4 - 8	6.2	6.2	8
<i>Sta. epidermidis</i> (41)	Ciprofloxacin	.06 - .5	.12	.2	.25
	Norfloxacin	.12 - 1	.2	.25	.5
	Pipemidic acid	2 - > 64	12	32	64
	Nitrofurantoin	1 - 64	3.1	4	62

nisms tested. Ciprofloxacin had a MIC₉₀ equal to or less than 0.5 mg/l, except for *Acinetobacter*, and *Streptococcus faecalis* which was 1 mg/l. A hundred per cent of the strains were inhibited by concentrations of 4 mg/l of ciprofloxacin and norfloxacin required 8 mg/l.

Ciprofloxacin and norfloxacin showed a similar activity against *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*. Pipemidic acid was more active than nitrofurantoin against gram-negative microorganisms. By contrast, nitrofurantoin was more active than pipemidic acid against gram-positive cocci.

DISCUSSION

Ciprofloxacin is a new synthetic antibacterial agent from the quinolone group like norfloxacin and pipemidic acid. Pipemidic acid has drawback that it is not active against an important group of pathogenic organisms involved in urinary tract infections such as enterococci, *Staphylococcus* and some *Pseudomonas aeruginosa* (35% of the strains are resistant) (9); nitrofurantoin, on the other hand, is active against the enterococci but has the drawback that a percentage of gram-negative bacilli species such as *Pseudomonas*, *Proteus* and *Acinetobacter* are resistant (3). Ciprofloxacin and norfloxacin were active against all the bacteria tested, ciprofloxacin was the most active compound against *Escherichia coli*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Providencia*, *Acinetobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, and *Streptococcus faecalis*. Ciprofloxacin and

norfloxacin showed a similar activity against *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Pseudomonas* and *Staphylococcus*, these results are similar to those reported recently in the literature (2, 5, 12).

Of particular benefit would be its activity against *Streptococcus faecalis* which is a frequent superinfecting organism in the treatment of complicated urinary tract infections.

The interesting *in vitro* activity of ciprofloxacin, particularly against *Pseudomonas aeruginosa*, combined with its good pharmacokinetic properties (3) suggest that it may prove to be useful in the treatment of more than urinary infections and may provide an alternative agent to treat infections which require parenteral antibiotics.

REFERENCES

1. BAILEY, R. R.; ROBERTS, A. P.; GOWER, P. E. and DE WARDENER, H. E. 1971. Prevention of urinary tract infection with low dose nitrofurantoin. *Lancet*, 1112-14.
2. BAUERNFEIND, A. and PETERMÜLLER, C. 1983. *In vitro* activity of ciprofloxacin, norfloxacin and nalidixic acid. *Eurp. J. Clin. Microbiol.*, 2, 111-15.
3. GRUMP, B.; WISE, R. and DENT, J. 1983. Pharmacokinetics and tissue penetration of ciprofloxacin. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24, 784-86.
4. FACKLAM, R. R. 1980. In: E. H. LENETTE, A. BALOWS, W. J. HAUSLER and J. P. TRUANT (ed.). *Manual of Clinical Microbiology*, 88-110. American Society for Microbiology, Washington D. C.
5. GADEBUSH, H. H.; SHUNGU, D. L.; WEINBERG, E. and CHUNG, S. K. 1982. Comparison of the antibacterial activity of norfloxacin (MK0366, AM715), a new organic acid, with that of other orally absorbed chemotherapeutic agents. *Infection*, 10, 41-44.

6. ITO, A.; HIRAL, K.; INOVE, M.; KOGA, H.; SUZUE, S.; IRIKURA, T. and MITSUHASHI, S. 1980. *In vitro* antibacterial activity of AM-715, a new nalidixic acid analog. Antimicrob. Ag. Chemother., 17, 103-8.
7. KING, A.; WARREN, C.; SHANNON, K. and PHILLIPS, I. 1982. *In vitro* antibacterial activity of norfloxacin (MK-0366). Antimicrob. Ag. Chemother., 21, 604-7.
8. KLOOS, W. E. and SMITH, P. B. 1980. In: E. H. LENETTE, A. BALOWS, W. J. HAUSSLER and J. P. TRUANT (ed.). Manual of Clinical Microbiology, 83-87. American Society for Microbiology, Washington D. C.
9. ROMÁN, J.; GARCÍA AGUAYO, J. M.; VILA, B. y GOBERNADO, M. 1982. Acido pipemidico: actividad antibacteriana *in vitro*. Rev. Diagn. Biol., 31, 47-54.
10. SHIMIZU, M.; NAKAMURA, S.; TAKASE, I. and KUROBE, N. 1975. Pipemidic acid: absorption, distribution and excretion. Antimicrob. Ag. Chemother., 7, 441-46.
11. SPENCER, R. C.; WHEAT, P. and SMITH, T. 1983. Antibacterial activity of norfloxacin. J. Antimicrob. Chemother., 12, 291-92.
12. TENNEY, J. H. and WARREN, J. W. 1983. Bactericidal activity of norfloxacin and nine other urinary tract antibiotics against gram-negative bacilli causing bacteriuria in chronically catheterized patients. J. Antimicrob. Chemother., 11, 287-90.
13. THORSBERRY, C. (ed.). 1980. Standard Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria which Grow Aerobically. National Committee for Clinical Laboratory Standards Villa Nova, P. A.

ESTUDIO COMPARATIVO DE CUATRO METODOS UTILIZADOS PARA LA DIFERENCIACION DE LOS GENEROS *STAPHYLOCOCCUS* Y *MICROCOCCUS*

M.^a L. GARCIA, I. MENES y B. MORENO

Departamento de Higiene, Inspección y Microbiología de los Alimentos, Facultad de Veterinaria,
Universidad de León

(Aceptado: 25 de octubre de 1984)

RESUMEN

Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de cuatro procedimientos recomendados para la diferenciación de estafilococos y micrococos. Las 71 cepas de cocos gram-positivos, catalasa-positivos, utilizadas, se habían aislado a partir de abscesos observados en canales y vísceras durante la inspección *post mortem* en el matadero, en diversas especies de animales de abasto. Los métodos comparados han sido: el estudio de la capacidad para producir ácido a partir de la glucosa en anaerobiosis, el tipo de crecimiento en un medio semisólido con tioglicolato, el esquema propuesto por Schleifer y Kloos (sensibilidad a la lisozima y a la lisostafina —ambas pruebas en placa—, y producción de ácido a partir del glicerol en un medio con eritromicina) y la susceptibilidad a la lisis por lisostafina empleando una técnica turbidimétrica. Por su capacidad de producir ácido anaeróbicamente a partir de la glucosa, 61 cepas habrían sido identificadas como estafilococos, 4 como micrococos y 6 como dudosas. El tipo de crecimiento de 67 cepas en el medio semisólido con tioglicolato correspondía al del género *Staphylococcus* y el de las 4 restantes al del género *Micrococcus*. De estas 4 últimas cepas, 2 tampoco fermentaban la glucosa y las otras 2 eran fermentadoras débiles. Según el esquema de Schleifer y Kloos, 66 cepas eran estafilococos. Tampoco en este caso concordaban los resultados con los de las otras pruebas, ya que 4 cepas clasificadas como estafilococos por los otros tres métodos presentaban una combinación de propiedades muy diferente de la esperada. Finalmente, todas las cepas fueron sensibles a

la lisostafina (1 U/ml), razón por la cual fueron adscritas definitivamente al género *Staphylococcus*.

Se discute la validez de las pruebas ensayadas y se propone el estudio de la sensibilidad a la lisostafina como prueba única para la diferenciación de los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus*.

SUMMARY

Four procedures proposed for separating staphylococci from micrococci were compared. The methods assayed were: ability to produce acid from glucose anaerobically, Evans and Kloos' test, Schleifer and Kloos' scheme and lysostaphin sensitivity. The strains used in this study were 71 gram-positive, catalase-positive cocci, isolated from abscesses found in slaughtered animals. On the basis of glucose fermentation, 61 strains would have been classified as staphylococci and 4 as micrococci. The remaining 6 strains were weak acid producers. Sixty seven cultures grew anaerobically in the medium used in Evans and Kloos' test (staphylococci) and 4 were negative (micrococci). Of these latter strains, 2 did not ferment glucose but 2 showed moderate glucose fermentation. According to the results of the Schleifer and Kloos scheme, the number of staphylococci were 66. It must be noted, however, that 4 strains negative in this test were classed as staphylococci on the basis of the results obtained in the other three tests. Finally, the 71 cultures were sensitive to lysostaphin (1 U/ml). Taking into account that lysostaphin sensitivity is a property directly related to the cell wall peptidoglycan composition of staphylococci, all strains studied could be definitively classified as members of the genus *Staphylococcus*. The usefulness of the procedures employed is discussed.

From the results obtained it can be concluded that the lysostaphin sensitivity test is a more reliable test than remaining three methods assayed.

INTRODUCCIÓN

Los métodos que permiten diferenciar con mayor fiabilidad los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* son aquellos que investigan propiedades básicas de las cepas,

tales como el contenido en citosina + guanina del ADN o la composición de la pared celular. Las técnicas correspondientes resultan, sin embargo, poco prácticas, ya que su complejidad impide que sean utilizadas en el trabajo de rutina del laboratorio. Por este moti-

vo, se han propuesto en los últimos años múltiples pruebas y esquemas de identificación de relativa facilidad de ejecución, basados en el estudio de propiedades tan variadas como la producción de ácido anaeróbicamente a partir de la glucosa (16), el crecimiento en un medio semisólido con tioglicolato (4), la susceptibilidad a la lisis por lisostafina o/y lisozima (1, 12), la sensibilidad al compuesto vibriostático 0/129 (3), la producción de ácido a partir de glicerol en un medio con eritromicina (12), el crecimiento en un medio con nitrofurantoína (6), la actividad bacteriolítica (17), etc.

De todas estas pruebas y esquemas de diferenciación, las que gozan de mayor aceptación son las dos primeras, fermentación de la glucosa y crecimiento en un medio semisólido con tioglicolato (4, 16), el esquema propuesto por Schleifer y Kloos (12) y el estudio de la sensibilidad a la lisis por lisostafina (1). En nuestra experiencia (5), esta última prueba es muy fiable, ya que proporciona indirectamente información sobre una propiedad fundamental: la composición de los peptidoglicanos de la pared celular. En efecto, la fracción endopeptidasa de la enzima actúa específicamente sobre los enlaces de las moléculas de glicocola presentes en los puentes interpeptídicos de los estafilococos y no en los de los micrococos.

El objetivo de este trabajo ha sido evaluar la utilidad y fiabilidad de las tres pruebas y del esquema citado anteriormente en la adscripción a los géneros *Staphylococcus* y *Micrococcus* de una población de Micrococcaceae de origen animal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Las 71 cepas de cocos gram-positivos, catalasa-positivos, utilizadas en este estudio habían sido aisladas por nosotros (9) a partir de abscesos y otras lesiones supuradas encontradas durante la inspección *post mortem* en vísceras y canales de otros tantos animales de abasto (óvidos, vacuno, cerdos y cápridos).

Fermentación anaeróbica de la glucosa

Esta propiedad se investigó siguiendo la técnica recomendada por el Subcomité de Taxonomía de Estafilococos y Micrococos (16), midiéndose el pH final del medio a los 5 d de incubación. Paralelamente, se estudió la capacidad de las cepas para utilizar este azúcar en aerobiosis. Las cepas se consideraron fermentadoras (+) cuando el pH del medio era menor de 5,7, fermentadoras débiles ($\pm$) cuando oscilaba entre 5,7 y 6,5, y no fermentadoras (—) cuando era superior a 6,5.

Crecimiento y tipo de crecimiento en medio semisólido con tioglicolato

La prueba se llevó a cabo según las indicaciones de Evans y Kloos (4). Los resultados se puntuaron de la forma siguiente: 3+, crecimiento denso a lo largo de todo el tubo; 2+, crecimiento poco denso a lo largo de todo el tubo; 1+, colonias sueltas a lo largo de todo el tubo, y —, crecimiento sólo en superficie.

Pruebas del esquema de Schleifer y Kloos

Para el ensayo de la producción de ácido aeróbicamente en un medio con glicerol + eritromicina (0,4 µg/ml), se siguió la técnica propuesta por Schleifer y Kloos (12). Se consideraron positivas (+) las cepas que, a las 72 h, producían ácido en cantidad suficiente para que la zona de viraje se extendiese al medio circundante, y negativas (—) aquéllas en que no se apreciaba ningún cambio. Si el indicador viraba únicamente debajo de la estría de crecimiento, se consideraba a la cepa como débilmente positiva (±). La sensibilidad a la lisostafina se investigó de acuerdo con la técnica en placa descrita por Schleifer y Kloos (12). La lisostafina (Schwarz-Mann) se utilizó a una concentración de 200 µg/ml. También para el estudio de la sensibilidad a la lisozima se siguió la técnica en placa propuesta por Schleifer y Kloos (12), empleando una solución de 50 µg/ml de lisozima (Sigma).

Susceptibilidad a la lisis por lisostafina

Esta prueba se llevó a cabo según la técnica turbidimétrica propuesta por Gutiérrez y cols. (5), con una modificación en la interpretación de los resultados, consistente en establecer el 80% de reducción en la densidad óptica (DO), en lugar del 70%, para diferenciar las cepas de sensibilidad intermedia de las muy sensibles. Así, las cepas se consideraron muy sensibles (MS) si a los 20 min de incubación a 37 °C mostraban una reducción en la DO del 80% o su-

perior. Cuando la reducción de la DO era inferior al 20%, las cepas se clasificaron como poco sensibles (PS). Las cepas que mostraron reducciones en la DO que oscilaban entre el 20 y el 80% fueron consideradas de sensibilidad intermedia (Int.).

Se utilizaron como controles las cepas patrón *Staphylococcus aureus* FDA 209P, *Micrococcus luteus* NCTC 2665 y *Sarcina lutea* ATCC 9341. La actividad autolítica de las cepas fue, asimismo, determinada.

RESULTADOS

Fermentación anaeróbica de la glucosa

Los resultados obtenidos se recogen en la *tabla 1*. En aerobiosis, 61 cepas oxidaron la glucosa, 7 lo hicieron débilmente y 3 fueron negativas.

Crecimiento y tipo de crecimiento en agar semisólido con tioglicolato

Los datos correspondientes a esta prueba se presentan también en la *tabla 1*. Por lo que respecta al tipo de crecimiento, 64 cepas fueron puntuadas como 3+, 1 como 2+, 2 como 1+ y 4 como —.

Esquema de Schleifer y Kloos

En la *tabla 1* se muestran asimismo las combinaciones de propiedades presentadas por las cepas en las pruebas incluidas en el esquema mencionado.

Tabla 1. Comparación de los resultados obtenidos en la identificación por cuatro procedimientos distintos de 71 cepas de cocos gram-positivos, catalasa-positivos, aislados de abscesos hallados en diferentes especies animales durante la inspección post mortem.

Glucosa anaerobiosis	Posible género(*)	Prueba de Evans y Kloos	Posible género	Esquema de Schleifer y Kloos			Número de cepas	Posible género	Sensibilid. a la lisostafina (turbidimétrico)(**)	Género			
				Sensibilidad a la		Acido a partir de glicerol							
				Lisozima	Lisostafina								
61 +	Staph.	61 +	Staph.	{	—	+	+	49	Staph.	{	29 MS	Staph.	
					—	±	+	7	Staph.		24 Int		
					—	+	±	1	Staph.		8 PS		
					±	+	+	1	?				
					—	±	—	1	?				
					+	±	+	1	?				
					±	±	+	1	?				
6 ±	?	4+	{	Staph.	—	+	+	3	Staph.	{	2 MS	Staph.	
		2—			Microc.	—	±	+	3		Staph.		2 Int
4—	Microc.	2+	{	Staph.	—	+	+	1	Staph.	{	4 Int	Staph.	
		2—			Microc.	—	±	+	2				Staph.
						—	+	—	1				?

(*) Staph., *Staphylococcus*. ?, dudoso. Microc., *Micrococcus*. (**) MS, muy sensible. Int, sensibilidad intermedia. PS, poco sensible.

Sensibilidad a la lisis por lisostafina

También en la *tabla 1* se recogen los datos relativos a la sensibilidad a la lisostafina de las cepas estudiadas.

DISCUSIÓN

Teniendo en consideración la capacidad de las cepas para producir ácido de la glucosa en anaerobiosis (16), podríamos identificar 61 de ellas como estafilococos, 4 como micrococos y 6 como de clasificación dudosa. Sin embargo, al ser todas ellas sensibles a 1 U/ml de lisostafina (1), puede afirmarse que la totalidad de la población estudiada pertenecía al género *Staphylococcus*. Como ya se indicó en la introducción, esta enzima actúa únicamente sobre la pared celular de los estafilococos y no de los micrococos, ofreciendo información sobre la composición de los peptidoglicanos de la misma. La validez de esta prueba ha sido señalada por buen número de investigadores (5, 7-8, 13, 15), habiéndose demostrado de forma concluyente que la lisostafina lisa exclusivamente cocos gram-positivos, catalasa-positivos, que poseen un ADN con bajo contenido en citosina + guanina (estafilococos) y que esta lisis tiene lugar aún en cepas cuyas propiedades bioquímicas no coinciden con las características de este género. Las diferencias en el grado de sensibilidad son debidas a que, en ciertas especies, una o varias de las moléculas de glicocola están sustituidas por alanina o serina (11, 14).

La separación de estafilococos y micrococos basada en la capacidad de los primeros para crecer y producir ácido a partir de la glucosa en anaerobiosis es, no sólo el procedimiento más antiguo, sino también el más utilizado. En un trabajo publicado en 1967, Mortensen y Kocur (10) pusieron de manifiesto que existía una buena correlación entre el bajo contenido en citosina + guanina y la capacidad de las cepas para fermentar la glucosa. Sin embargo, en la última década son cada vez más frecuentes los investigadores que critican la validez de este método (2, 5, 11). La razón de este desacuerdo podría ser que los trabajos iniciales se realizaron, casi exclusivamente, con cepas de origen humano, de propiedades bien definidas y uniformes, pero al estudiarse más exhaustivamente poblaciones de otros orígenes se pusieron de manifiesto importantes discrepancias, ya que se comprobó la existencia de cepas de estafilococos que no fermentaban la glucosa y cepas de micrococos que sí lo hacían. En este trabajo, que se refiere a cepas de origen animal, al menos 4 de ellas habrían sido erróneamente clasificadas como micrococos si sólo hubiésemos realizado esta prueba.

El estudio del tipo de crecimiento en el medio semisólido con tioglicolato, propuesto por Evans y Kloos (4) y recomendado por otros investigadores (12-13), parece ser, en principio, una prueba menos restrictiva que la de producción de ácido a partir de la glucosa en anaerobiosis. En nuestro caso, como puede observarse en la *tabla 1*, 67 cepas pudieron ser claramente identificadas como estafi-

lococos. Las 4 cepas restantes, en principio, corresponderían a micrococos y deberían coincidir con las 4 cepas no fermentadoras de la glucosa en la prueba anterior. Sin embargo, esto no es así, ya que 2 de ellas eran cepas fermentadoras. La falta de correlación entre ambos métodos que, en realidad, estudian la misma propiedad, ha sido puesta de manifiesto por Baird-Parker (2). Resulta obvio que la utilización conjunta de las dos pruebas complica la identificación.

Refiriéndonos ahora al esquema de identificación propuesto por Schleifer y Kloos (12), encontramos que 66 cepas mostraban una combinación de propiedades que correspondía a la del género *Staphylococcus* (resistencia a la lisozima, sensibilidad a la lisostafina y capacidad de producción de ácido a partir del glicerol en un medio con eritromicina). Entre estas 66 cepas se hallaban las 6 débilmente productoras de ácido a partir de la glucosa, y 3 de las 4 no fermentadoras. Puede parecer, por tanto, que este esquema podría ser útil para identificar estafilococos con propiedades conflictivas. Sin embargo, 4 de las cepas que por las características que presentaban en las restantes pruebas correspondían a estafilococos, dieron resultados en este esquema de identificación que se apartaban notablemente de los esperados. Por otra parte, es de destacar que, en nuestra experiencia, la lectura de las pruebas que integran este esquema es frecuentemente muy confusa y la interpretación de los diversos resultados posibles complicada y de difícil aplicación práctica.

Considerando de forma conjunta los tres últimos métodos discutidos (producción de ácido anaeróbicamente a partir de la glucosa, prueba de Evans y Kloos y esquema de Schleifer y Kloos), parece posible concluir que ninguno de ellos resulta totalmente satisfactorio a la hora de identificar cocos gram-positivos, catalasa-positivos, de origen animal. Por otra parte, la utilización combinada de dos de estas pruebas o de las tres no sólo no facilita la clasificación de las cepas, sino que la complica enormemente.

Tanto Baird-Parker (2) como Schleifer y Kloos (13) han señalado que un criterio de clasificación que combinase el crecimiento en anaerobiosis con el estudio de la sensibilidad a la acción lítica de la lisostafina sería el mejor método para la diferenciación de estafilococos y micrococos. Sin embargo, nuestros resultados indican que es suficiente la prueba de sensibilidad a la lisostafina utilizando el método turbidimétrico propuesto por nosotros (5). En nuestra experiencia, esta prueba, que no es excesivamente complicada, resulta un procedimiento muy fiable para la identificación de cocos gram-positivos, catalasa-positivos, tanto de origen humano como animal. La prueba en placa resulta más difícil de interpretar por no ser cuantitativa.

BIBLIOGRAFÍA

1. BAIRD-PARKER, A. C. 1974. Genus II. *Staphylococcus* Rosenbach 1884, nom. cons. Opin. 17 Jud. Comm. 1958. En: R. E. BUCHANAN and E. GIBBONS (ed.). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed., 483-89. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

2. BAIRD-PARKER, A. C. 1974a. The basis for the present classification of staphylococci and micrococci. En: W. YOTIS. (ed.), Recent advances in staphylococcal research. Ann. N. Y. Acad. Sci., 236, 7-14.
3. BOUVET, P.; CHATELAIN, R., ET RIOU, J. Y. 1982. Intérêt du composé vibriostatique 0/129 pour différencier les genres *Staphylococcus* et *Micrococcus*. Ann. Microbiol. Paris, 133B, 449-53.
4. EVANS, J. E., and KLOOS, W. E. 1972. Use of shake cultures in a semisolid thioglycolate medium for differentiating staphylococci from micrococci. Appl. Microbiol., 23, 326-31.
5. GUTIERREZ, L. M.; MENES, I.; GARCÍA, M. L., and MORENO, B. 1981. Sensitivity to lysostaphin as a criterion for the identification of staphylococci from animal origin. J. Appl. Bacteriol., 50, 541-49.
6. HERBERT, J. P. et CAILLET, R. 1983. Différenciation entre microcoques et staphylocoques par l'étude de la sensibilité à la nitrofurantoïne. Path. Biol., 31, 214-16.
7. KLESIOUS, P. H. and SCHUHARDT, V. T. 1968. Use of lysostaphin in the isolation of highly polymerized deoxyribonucleic acid and in the taxonomy of aerobic Micrococcaceae. J. Bacteriol., 95, 739-43.
8. LACHICA, R. V. F.; HOEPRICH, P. O. and GENIGEORGIS, C. 1971. Nuclease production and lysostaphin susceptibility of *S. aureus* and other catalase positive cocci. Appl. Microbiol., 21, 823-26.
9. MENES, I.; GARCÍA, M. L., y MORENO, B. 1983. Los abscesos encontrados en inspección de carnes como origen de estafilococos coagulasa-positivos. An. Fac. Vet. León. Univ. León, 29, 317-26.
10. MORTENSEN, N., and KOCUR, M. 1967. Correlation of DNA base composition and acid formation from glucose of staphylococci and micrococci. Acta Pathol. Microbiol. Scand., 69, 445-57.
11. SCHLEIFER, K. H., and KANDLER, O. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. Bacteriol. Rev., 36, 407-77.
12. SCHLEIFER, K. H., and KLOOS, W. E. 1975. A simple test system for the separation of staphylococci from micrococci. J. Clin. Microbiol., 1, 337-38.
13. SCHLEIFER, K. H. and KLOOS, W. E. 1976. Separation of staphylococci from micrococci. En: J. JELJASZEWICZ (ed.), Staphylococci and Staphylococcal Diseases, 3-9. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.
14. SCHLEIFER, K. H., and KOCUR, M. 1973. Classification of staphylococci based on chemical and biochemical properties. Arch. Mikrobiol., 93, 65-85.
15. SCHUHARDT, V. T. 1965. Discusión final del trabajo de Baird-Parker, A. C. Staphylococci and their classification. Ann. N. Y. Acad. Sci., 128, 19-25.
16. Subcommittee on taxonomy of staphylococci and micrococci. 1965. Minutes of first meeting. Int. J. Syst. Bacteriol., 15, 107-8.
17. VARALDO, P. E.; GRAZI, G.; CISANI, G., and SATTA, G. 1979. Routine separation of staphylococci from micrococci based on bacteriolytic activity production. J. Clin. Microbiol., 9, 147-48.

FENOMENOS NUCLEARES Y CORTICALES DURANTE LA CONJUGACION DE *GLAUCOMA CHATTONI* (CILIOPHORA, GLAUCOMIDAE)

ANA MARTIN-GONZALEZ, SUSANA SERRANO y D. FERNANDEZ-GALIANO
Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid

(Aceptado: 30 de diciembre de 1984)

RESUMEN

Se describe por primera vez el proceso de conjugación de *Glaucoma chattoni* haciendo especial referencia a las transformaciones nucleares. Este proceso incluye tres divisiones pregámicas o de maduración, la primera de ellas reduccional. El sincarion se divide dos veces, originando cuatro núcleos, uno de los cuales será micronúcleo, dos se transformarán en anlagen o esbozos macronucleares y el otro degenerará. Durante la conjugación, los conjugantes experimentan una degeneración paulatina de las estructuras orales. Asimismo, se realizan algunas precisiones sobre la morfología de este ciliado, comparando nuestras observaciones con los datos obtenidos por otros autores hasta el presente.

SUMMARY

For the first time, the conjugation process of *Glaucoma chattoni* is described, specially the different nuclear changes. This process involves three pregamic or maturation divisions, the first one is reductional. The synkaryon divides twice, yielding four nuclei; one of them will be micronucleus, two will become anlagen or macronuclear primordia and the other one will degenerate. The oral structures of the conjugants undergo a gradual degeneration during the conjugation. Besides, some data about the morphology of this ciliate are reported, our observations are compared with the results obtained by other authors until now.

INTRODUCCIÓN

En 1959, Corliss crea la nueva especie *Glaucoma chattoni* separándola de la especie tipo del género *G. scintillans*. Este autor consideró como caracteres morfológicos distintivos entre ambas especies el tamaño y la forma del cuerpo, el número de cinetias somáticas y cinetias postorales y, por último, la estructura del argiroma.

A partir de su descripción se han realizado numerosos trabajos de *Glaucoma chattoni* sobre el proceso de morfogénesis (9-11), ultraestructura (16-17) y fisiología (7, 12).

Posteriormente, Corliss (3) separa el género *Glaucoma* de la familia Tetrahymenidae, creando la nueva familia Glaucomidæ.

En 1975 McCoy realiza un nuevo intento de separar dos especies, teniendo en cuenta principalmente el «pattern factor» o factor de corteza descrito por Cho (5), la mayor o menor longitud de la cinetia somática 2 y pequeñas diferencias en la organización cinetosómica de las tres membranas orales y el cuerpo X. Según este autor *Glaucoma chattoni* parece ser un sinónimo de *G. reniformis* y *G. macrostoma* y, muy probablemente, un sinónimo de *G. scintillans* debido a diferencias nutricionales, de manera que *G. scintillans* sería una superespecie, incluyendo varias especies biológicas o singenes distintos.

En el presente estudio se realizan observaciones morfológicas detalladas sobre una cepa con características morfológicas intermedias entre las especies *Glaucoma chattoni* y *G. scintillans*, que hemos clasificado como *G. chatto-*

ni según las descripciones de Corliss (2-3), Czapik (4) y Peck (16). Asimismo, tras la revisión bibliográfica sobre ambas especies y la gran similitud de caracteres morfológicos y del proceso conjugativo, se realizan algunas consideraciones sobre la validez de la especie *G. chattoni*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La especie objeto de nuestro estudio procede de una serie de muestras recogidas en la localidad de Buitrago (Madrid). Una vez en el laboratorio, dichas muestras fueron enriquecidas mediante la adición de granos de trigo (2 granos/50 ml muestra) con el fin de incrementar el desarrollo de las poblaciones bacterianas autóctonas, manteniéndose en condiciones estándar de 20 °C ($\pm 1^\circ$) de temperatura y un ritmo alternante de 12 h de luz/12 h de oscuridad.

A partir de estas muestras originales se realizaron aislamientos poblacionales de *Glaucoma chattoni* según el siguiente procedimiento: grupos de 30-50 individuos se distribuyeron en tubos de ensayo que contenían cada uno 10 ml de medio de lechuga (1,5 g polvo de lechuga desecada/1.000 ml agua destilada), inoculados 24 h antes con *Enterobacter aerogenes*. Estos cultivos se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales que las utilizadas en el caso de las muestras originales, realizándose resiembras periódicas cada 48 h para que la tasa de crecimiento permaneciera siempre elevada. Tras varios días de cultivo se indujo la aparición de parejas de conju-

gantes por el método de agotamiento del medio nutritivo (18-19).

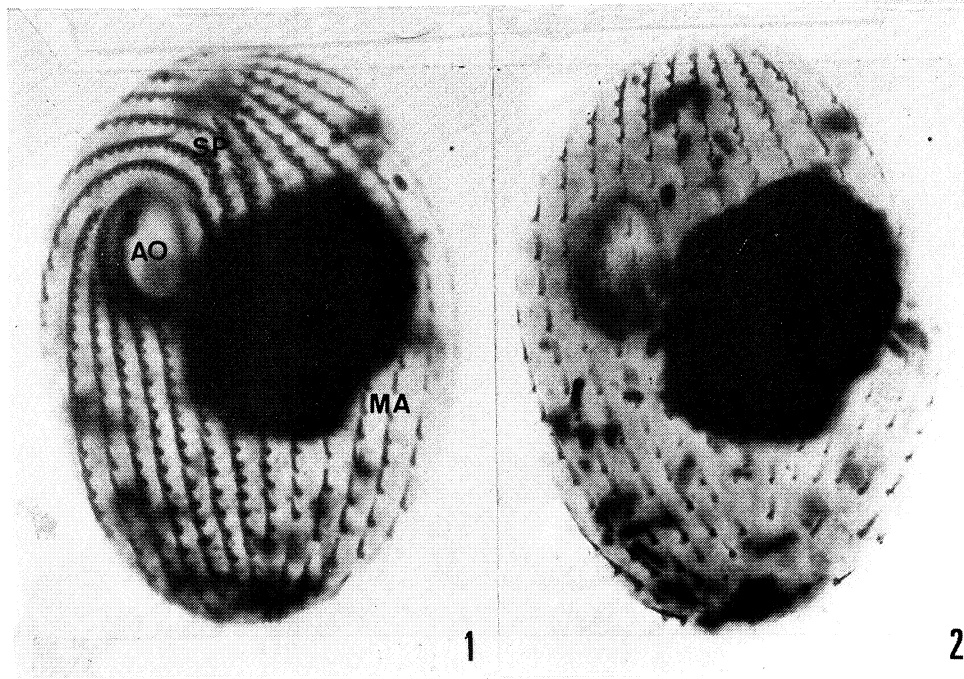
Cuando se observó la formación de las primeras parejas se extrajeron cada 30 min partes alícuotas de cada uno de los cultivos para proceder a su tinción, hasta varias horas después de la desaparición total de las parejas en los mismos.

El estudio citológico de las variaciones nucleares y corticales a lo largo del proceso conjugativo se realizó utilizando la técnica de impregnación argéntica del carbonato de plata (8). Asimismo, estas observaciones fueron confirmadas por la técnica de tinción nuclear, más específica, de la orceína acética (13).

RESULTADOS

Glaucoma chattoni es un ciliado himenostomado perteneciente a la familia Glaucoridae. Esta especie tiene una forma elipsoidal, y en nuestra cepa los individuos fijados presentan 45-55 μm de longitud por 32-42 μm de anchura. El aparato nuclear consta de un macronúcleo oval situado en el tercio medio del cuerpo y un micronúcleo esférico, muy voluminoso, próximo al macronúcleo, quedando con frecuencia enmascarado por él (figuras 1-2).

La infraciliación somática está constituida por 25-28 cinetias meridianas, de las cuales 5-6 son post-

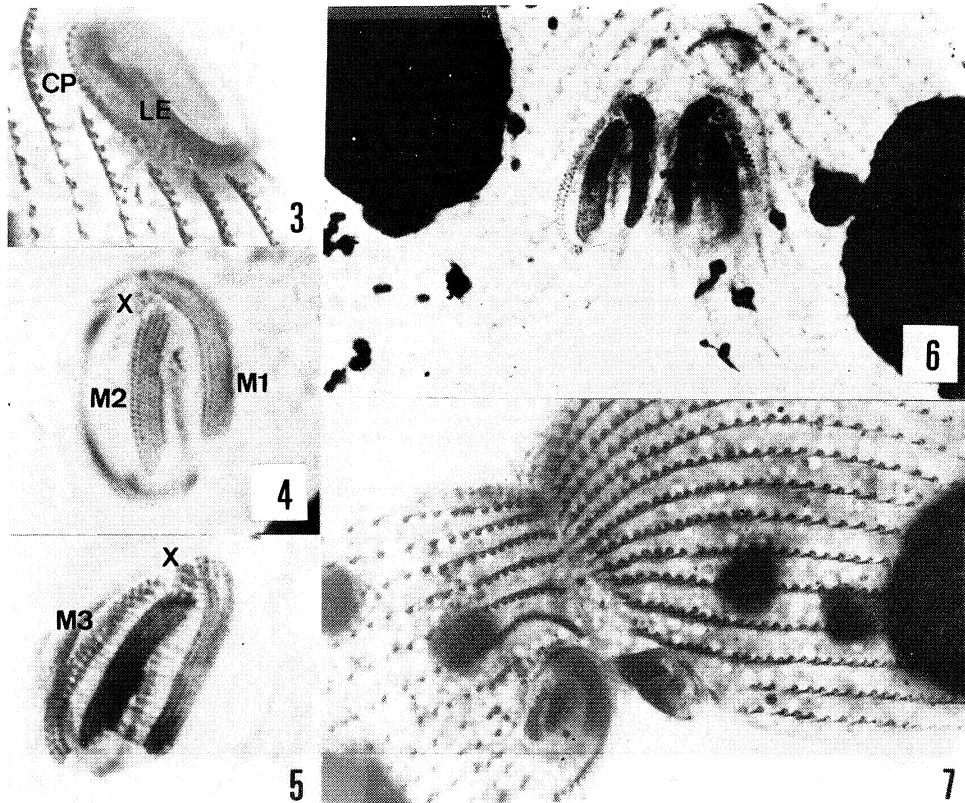


Figuras 1-2. 1) Aspecto general de un individuo vegetativo por su cara ventral, observándose la infraciliación somática en esta zona, la sutura preoral (SP), la abertura oral (AO) y el macronúcleo (MA). X 3.500. 2) Microfotografía del mismo ejemplar de *G. chattoni* por su cara dorsal, donde se muestra la distribución de las cinetias somáticas en esta zona que terminan a distintas alturas en el polo posterior del cuerpo. X 3.500

orales (figura 1). No todas estas cinetias somáticas alcanzan el polo posterior del cuerpo, sino que terminan a distintas alturas (figura 2). La sutura preoral se dispone oblicuamente al eje antero-posterior del cuerpo y es de muy poca extensión. Dicha sutura está formada por el enfrentamiento regular de los extremos anteriores de las 4 cinetias no suborales situadas inmediatamente a la derecha del citostoma, cuyo extremo terminal ante-

rior se incurva hacia la izquierda, y las 4-5 cinetias no suborales a la izquierda de la abertura bucal (figura 1).

La infraciliación oral se compone de tres membranelas (M1, M2 y M3) situadas a la izquierda del citostoma, y una cinetia paroral con una sola fila de 17-18 cinetosomas que bordea el prominente labio ectoplásmico de la abertura oral por su parte externa (figura 3).



Figuras 3-7. 3) Detalle de la zona oral de *G. chattoni* donde se observa la localización de la cinetia paroral (CP) bordeando el labio ectoplásmico (LE). X 4.500. 4-5) Infraciliación oral. En estas microfotografías se muestra la disposición de los cinetosomas componentes de las tres membranelas orales: M1, M2, M3 y el cuerpo X. X 4.500. 6-7) Detalles de la zona de unión en dos parejas de conjugantes en una etapa temprana (figura 6) y otra etapa mucho más avanzada (figura 7) de la conjugación. Obsérvese la reducción del tamaño de la abertura bucal y la desorganización de las estructuras orales. X 3.300

La membranela M1, aquella situada más a la izquierda de la cavidad bucal, está formada por 6 filas de cinetosomas, de distinta longitud. La M2, en posición intermedia, se compone de 6 filas de cinetosomas, siendo mucho más corta que las restantes la fila más cercana a la M1. La M3 siempre posee 3 filas de cinetosomas de aproximadamente la misma longitud. Cerca al extremo anterior de la M2 existe un grupo irregular con varios cinetosomas, denominado cuerpo X (*figuras 4-5*).

Proceso de conjugación

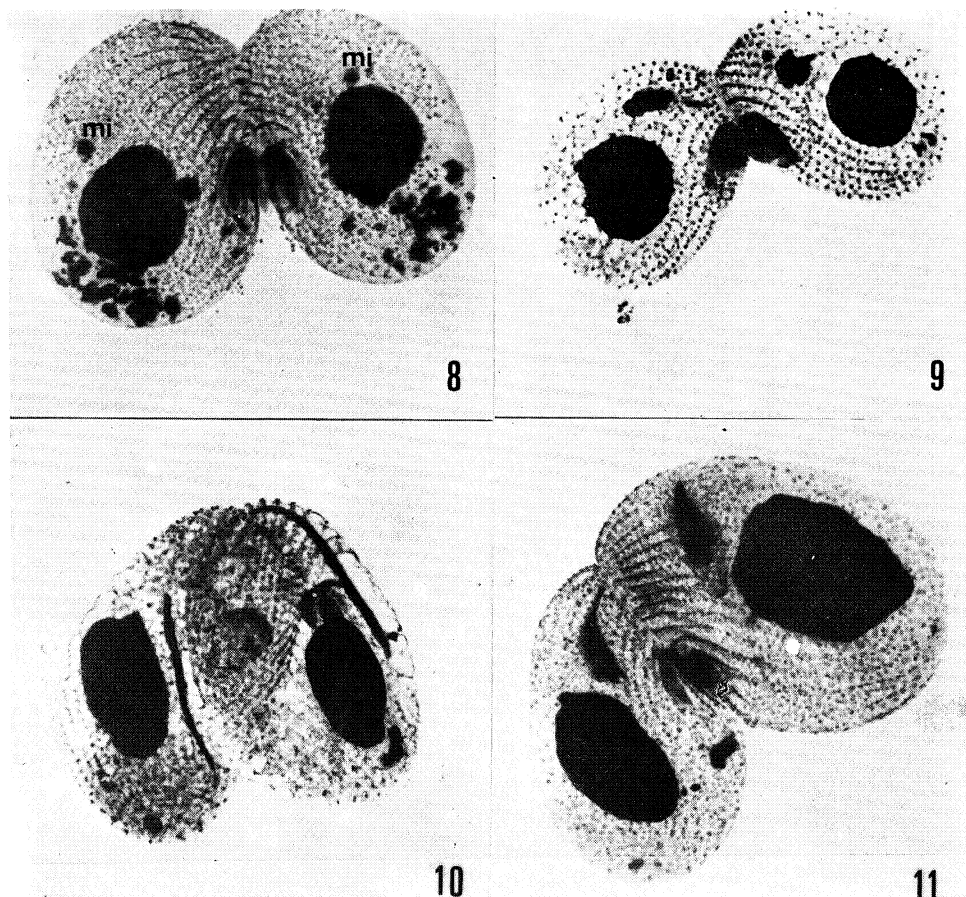
Unión de los conjugantes. La conjugación comienza con la unión de dos individuos vegetativos por sus correspondientes suturas preorales, sin que se produzca la rotura o escisión de ninguna de las cinetias somáticas. En cada pareja de conjugantes la unión se realiza de tal manera que ambas infraciliaciones orales aparecen como imágenes especulares entre sí, observándose simultáneamente la región ventrolateral izquierda de la superficie celular de un individuo y la región ventro-lateral derecha del otro componente del par (*figuras 6-7*).

Fenómenos nucleares. Poco después de la unión de los conjugantes en parejas, el micronúcleo diploide de cada conjugante, situado junto al macronúcleo en los individuos vegetativos, emigra hacia la mitad anterior del cuerpo (*figura 8*). A continuación, se produce un aumento notable del volumen micronuclear, que corresponde al comienzo de la profase meiótica I (*figura 9*). Posteriormente tiene lugar un proceso de elongación mi-

cronuclear, debido a la disposición longitudinal de los cromosomas, de tal manera, que el micronúcleo adopta un aspecto cintiforme (*figura 10*). Este estadio es el denominado «crescent stage» o estadio de la media luna. En una etapa más avanzada de la profase I, se produce un acortamiento longitudinal y paulatino del micronúcleo conocido con el nombre de «shortening crescent stage» o estadio de acortamiento de la media luna (*figura 11*). Como resultado de esta primera división de maduración se forman 2 núcleos haploides en cada célula (*figura 12*) que experimentarán, a su vez, una segunda división meiótica de maduración de tipo ecuacional, originando 4 núcleos (*figura 13*). Sólo uno de estos 4 productos meióticos entra en la tercera división pregámica, dando lugar a dos pronúcleos: emigrante y estacionario, en cada individuo. Estos dos pronúcleos se diferencian entre sí tanto por su forma como por su localización. El pronúcleo emigrante es fusiforme y se encuentra en el tercio anterior del cuerpo, muy próximo a la zona de unión, mientras que el pronúcleo estacionario, de forma más o menos esférica, se localiza en una región más cercana al ecuador (*figuras 14-15*).

El pronúcleo emigrante de cada conjugante pasa al otro individuo constituyente del par, donde se fusionará con el pronúcleo estacionario del mismo, dando lugar a un sincarion diploide.

Los otros tres núcleos resultantes de la segunda división de maduración comienzan un proceso degenerativo progresivo poco después de su formación, hasta que



Figuras 8-11. 8) Conjugación de *G. chattoni*, inicio de los procesos nucleares. *mi*, micronúcleo. X 1.400. 9) Profase meiótica. I. Aumento del volumen micronuclear. X 1.600. 10) Profase meiótica. I. Estadio de la media luna. X 1.600. 11) Profase meiótica. I. Acortamiento de la media luna. X 1.600

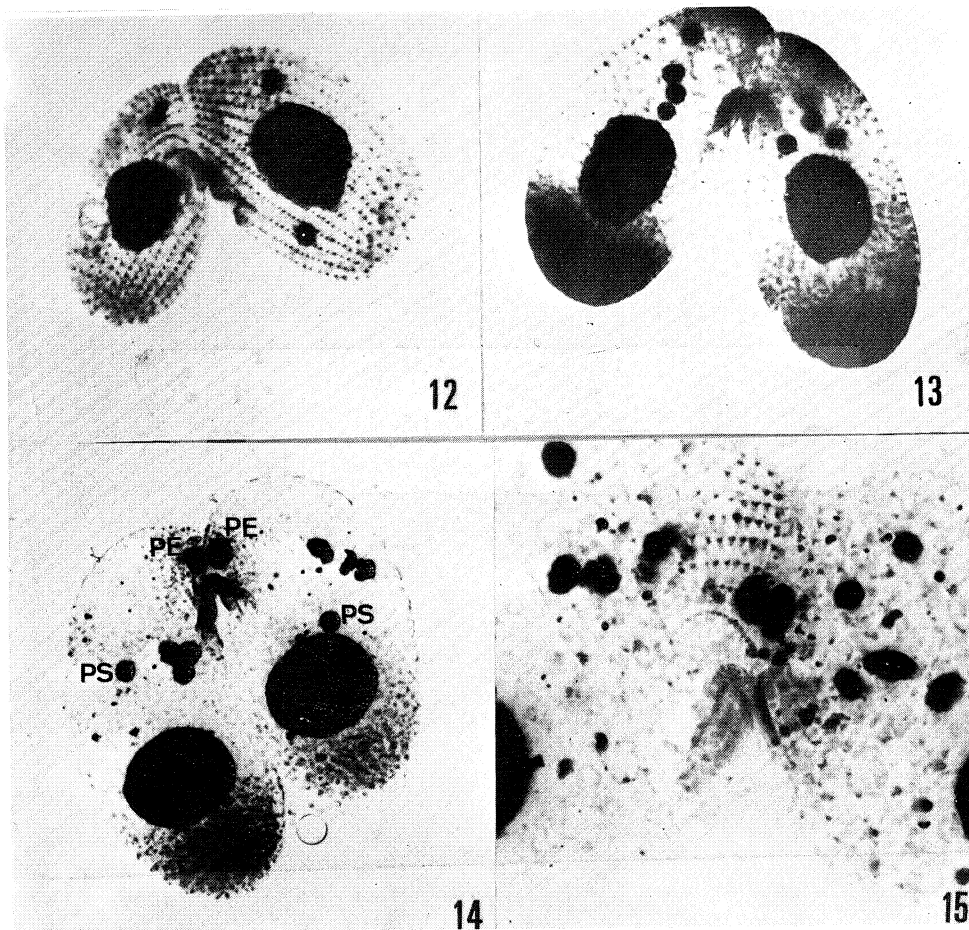
desaparecen una vez formado el sincarion o núcleo cigótico.

El sincarion se divide mitóticamente dos veces consecutivas (primera y segunda divisiones postcigóticas) dando lugar a cuatro núcleos (figuras 16-17). Dos de estos núcleos aumentan de tamaño y se transforman en anlagen o esbozos macronucleares; los otros dos núcleos pasarán uno a ser micronú-

cleo, y el otro degenera (figuras 18-19).

Simultáneamente a estos procesos, el antiguo macronúcleo de cada individuo va degenerando por picnosis sin fragmentación.

A lo largo de la primera división del exconjugante se produce una segregación de los anlagen macronucleares y una división mitótica micronuclear, como resultado de

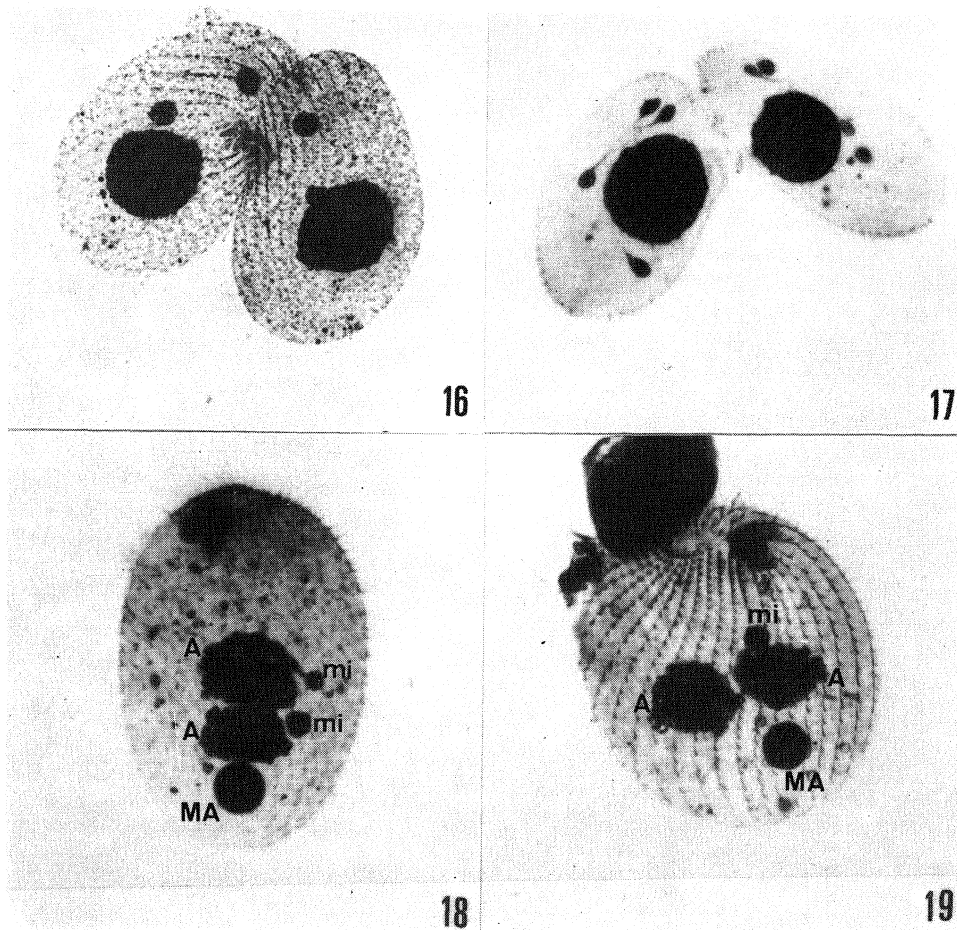


Figuras 12-15. 12) Final de la primera división de maduración. X 1.800. 13) Final de la segunda división de maduración. X 1.800. 14-15) Final de la tercera división de maduración. PE, pronúcleo emigrante; PS, pronúcleo estacionario. X 1.800, X 1.400

la cual se forman dos cariónides de cada exconjugante con la dotación nuclear característica del individuo vegetativo (un macronúcleo, un micronúcleo).

Modificaciones de la infraciliación oral y somática. En *Glaucoma chattoni* se ha observado que la infraciliación oral de cada indi-

viduo experimenta durante la conjugación un fenómeno de desdiferenciación progresiva, que se caracteriza por una desordenación de la infraciliación oral acompañada de una reducción del tamaño bucal (figuras 6-7). Como consecuencia de este fenómeno, los conjugantes de *G. chattoni* no se alimentan durante el proceso de con-



Figuras 16-19. 16) Final de la primera división del syncarion. X 1.400. 17) Telofase de la segunda división del syncarion. X 1.600. 18-19) Exconjugantes de *G. chattoni*. A, anlages macronucleares; mi, micronúcleo; MA, antiguo macronúcleo. X 1.800

jugación. Poco tiempo después de la separación de los individuos del par, se produce en cada exconjugante una reorganización de las estructuras orales infraciliares, sustituyéndose la boca atrófica por una neoformación.

Finalmente, hay que destacar que en *Glaucoma chattoni* no se observa cambio alguno en la infra-

ciliación somática de los individuos a lo largo del proceso de conjugación.

DISCUSIÓN

Según nuestras observaciones, los individuos de la cepa estudiada de *Glaucoma chattoni* miden 45-

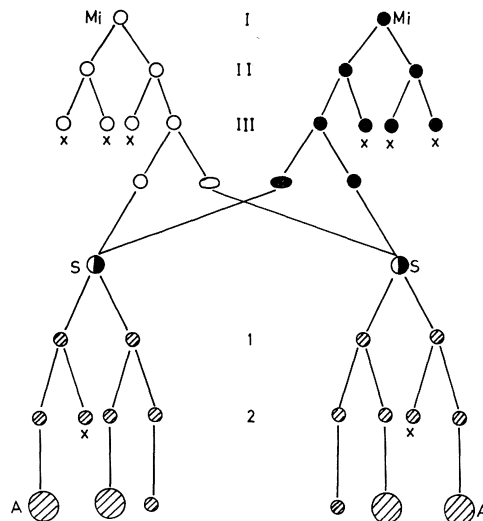


Figura 20. Divisiones y variaciones nucleares durante la conjugación de *G. chattoni*. I, II, III, divisiones de maduración; 1, 2, divisiones postgámicas. S, sincarion; A, anlagen macronucleares; Mi, micronúcleo

55 × 32-44 μm y presentan 25-28 cinetias somáticas y 5-6 meridianos postorales. Estos datos se corresponden con los señalados por diversos autores para *G. chattoni* (1, 3-4, 16). Sin embargo, considerando la configuración cinetosómica de las estructuras orales y la gran longitud de la cinetia 2, que prácticamente rodea el extremo anterior de la abertura bucal, esta cepa debería clasificarse como la especie *G. scintillans* (14). El hecho de que esta cepa presente caracteres intermedios entre ambas especies, nos lleva a considerar la posibilidad de que se trate de un complejo de «especies biológicas» o variedades genéticas, como ya señala McCoy (14), tras el estudio de las distintas cepas conocidas hasta esa fecha.

Con respecto a la conjugación, los distintos procesos nucleares

asociados a este fenómeno son muy similares a los descritos en *Tetrahymena pyriformis* (6), *Colpidium colpoda* (observaciones personales) y *Glaucoma scintillans* (15). En estos tres géneros el proceso de conjugación, esquematizado en la figura 20, siempre incluye tres divisiones de maduración y dos divisiones postcigóticas, si bien uno de los núcleos resultante de la segunda división del sincarion degenera.

BIBLIOGRAFÍA

1. CORLISS, J. O. 1954. The buccal apparatus and systematic status of *Glaucoma frontata* (*Dallasia frontata* Stokes). J. Morphol., 94, 199-220.
2. CORLISS, J. O. 1959. *Glaucoma chattoni* n. sp., an experimental organism which has been confused with the type species of the genus *G. scintillans*

- Ehrbg., 1830. J. Protozool., 6 suppl., 24.
3. CORLISS, J. O. 1971. Establishment of a new family (Glaucimidae n. fam.) in the holotrich hymenostome ciliate suborder Tetrahymenina, and description of a new genus (*Epenardia* n. g.) and a new species (*Glaucima dragescui* n. sp.). Trans. Amer. Micros. Soc., 90, 344-62.
 4. CZAPIK, A. 1968. La famille Tetrahymenidae et son importance dans la systématique et l'évolution des ciliés. Acta Protozool., 5, 315-17.
 5. CHO, P. L. 1971. Cortical patterns in two syngens of *Glaucima*. J. Protozool., 18, 180-83.
 6. ELLIOTT, A. M., and HAYES, R. E. 1953. Mating types in *Tetrahymena*. Biol. Bull., 105, 269-84.
 7. FENCHEL, T., and SMALL, E. 1980. Structure and function of the oral cavity and its organelles in the hymenostome ciliate *Glaucima*. Trans. Amer. Micros. Soc., 99, 52-60.
 8. FERNÁNDEZ-GALIANO, D. 1976. Silver impregnation of ciliated protozoa: procedure yielding good results with the pyridinated silver carbonate method. Trans. Amer. Micros. Soc., 95, 557-60.
 9. FRANKEL, J. 1960a. Effects of localized damage on morphogenesis and cell division in a ciliate, *Glaucima chattoni*. J. Exp. Zool., 143, 175-94.
 10. FRANKEL, J. 1960b. Morphogenesis in *Glaucima chattoni*. J. Protozool., 7, 362-76.
 11. FRANKEL, J. 1961. Spontaneous astomy: loss of oral areas in *Glaucima chattoni*. J. Protozool., 8, 250-56.
 12. HOLZ (Jr.), G. G.; WAGNER, B.; ERWIN, J. A., and KESSLER, D. 1961. The nutrition of *Glaucima chattoni*. J. Protozool., 8, 192-99.
 13. KIRBY, H. 1950. Materials and Methods in the Study of Protozoa. Univ. California Press, Berkeley and Los Angeles.
 14. MCCOY, J. W. 1975. Updating the tetrahymenids. IV. Cortical properties of *Glaucima*. Protistologica, 11, 149-58.
 15. NAKATA, A. 1969. Mating types in *Glaucima scintillans*. J. Protozool., 16, 689-92.
 16. PECK, R. 1974. Morphology and Morphogenesis of *Pseudomicrotorax*, *Glaucima* and *Dexiotricha*, with emphasis on the types of stomatogenesis in holotrichous ciliates. Protistologica, 10, 333-69.
 17. PITEKKA, D. R. 1961. Fine structure of the silverline and fibrillar systems of three tetrahymenid ciliates. J. Protozool., 8, 75-80.
 18. SONNEBORN, T. M. 1950. Methods in the general biology and genetics of *Paramecium aurelia*. J. Exp. Zool., 113, 87-147.
 19. SONNEBORN, T. M. 1970. Methods in *Paramecium* research. En D. M. PRESCOTT (ed.). Methods in Cell Physiology, 4, 241-339. Academic Press Inc., New York, London.

NUEVAS CORRIENTES EN EL DISEÑO DE AGENTES ANTIVIRICOS

B. ALARCON y L. CARRASCO

Centro de Biología Molecular y Departamento de Microbiología, Universidad Autónoma de
Madrid, Canto Blanco, Madrid

(Aceptado: 17 de septiembre de 1984)

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. <i>Introducción</i>	100
2. <i>Pasos de la replicación vírica. Posibles sitios de acción de agentes antivíricos</i>	100
3. <i>Agentes antivíricos que actúan contra herpesvirus</i>	101
3.1. <i>Vidarabina</i>	102
3.2. <i>BVDU</i>	102
3.3. <i>Aciclovir</i>	103
3.4. <i>Análogos de aciclovir</i>	105
3.5. <i>FIAC</i>	105
3.6. <i>Fosfonoformiato</i>	105
4. <i>Compuestos activos contra virus respiratorios RNA</i>	106
4.1. <i>Derivados del adamantano</i>	106
4.2. <i>Bencimidazoles</i>	107
4.3. <i>Flavonoides</i>	108
5. <i>Agentes antivíricos de amplio espectro</i>	108
5.1. <i>Ribavirina</i>	108
5.2. <i>DPH-Ade</i>	109
5.3. <i>Inhibidores de glicosilación</i>	109
5.4. <i>Inhibidores que penetran selectivamente en células infectadas por virus animales</i>	111
5.5. <i>Los interferones</i>	113
6. <i>Conclusiones y perspectivas futuras</i>	114
7. <i>Bibliografía</i>	115

1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años se está asistiendo a un enorme desarrollo de nuevos agentes antivíricos. Ello es debido en gran parte a que la vieja idea de la imposibilidad de desarrollar compuestos que inhibieran la replicación vírica sin afectar el metabolismo celular, ha sido modificada al descubrirse compuestos que bloquean el desarrollo vírico y que presentan muy poca toxicidad para las células. Las infecciones por virus suponen la causa mayor de enfermedad en el hombre (EEC Workshop, 1983), calculándose que un individuo puede sufrir por encima de 6 infecciones víricas diferentes cada año. A pesar del enorme interés médico que representaría el poder combatir eficazmente las enfermedades causadas por virus, aún se está muy lejos de alcanzar el éxito obtenido en otras áreas de la quimioterapia. Esto es debido, no sólo a causas intrínsecas propias de la biología de las infecciones víricas, sino también a causa del progresivo aumento de costes y el retraso que se ha producido en los últimos años en el desarrollo de nuevos fármacos. Entre las primeras causas está el hecho de que los virus son parásitos intracelulares que usan la maquinaria metabólica celular para su replicación, siendo pocas las funciones propias del virus. De otro lado, la gran diversidad existente entre las familias de los virus hace poco probable el hallazgo de una droga de amplio espectro. Entre las causas ajenas al virus podemos mencionar como fundamental el coste de las investigaciones. Se calcula que los costes toxicológicos y far-

macocinéticos del estudio de una droga, se han incrementado por 3,2 y 5,2 veces entre 1965 y 1979, inflación aparte (91). Otra causa es el aumento del tiempo que transcurre entre el descubrimiento de una sustancia con posible valor terapéutico y la finalización de los estudios en animales y la consiguiente evaluación clínica. Así, en 1975 se calculó que era de una media de 6 años, frente a los 2 años necesarios en la década de los 60 (39).

Por todo esto, la investigación en agentes antivíricos ha de hacerse sobre aquellas enfermedades de mayor importancia patológica o económica y para las cuales no existe una profilaxis adecuada, tipo vacuna. Son estas las producidas por virus respiratorios (gripe, rinovirus), el virus de la hepatitis B y por los herpesvirus (38).

2. PASOS DE LA REPLICACIÓN VÍRICA. POSIBLES SITIOS DE ACCIÓN DE AGENTES ANTIVÍRICOS

Existen una serie de pasos en la replicación vírica que pueden ser utilizados como blancos por sustancias con cierta especificidad (14) (*figura 1*). Estos pasos son:

- La entrada del virus.
- La descapsidación.
- El corte proteolítico de precursores.
- La síntesis de DNA o RNA víricos que es llevada a veces por polimerasas específicas (herpesvirus, ortomixovirus...).
- Maduración de los mRNA víricos (capping, metilación, poliadetilación...).
- Glicosilación de proteínas víricas.

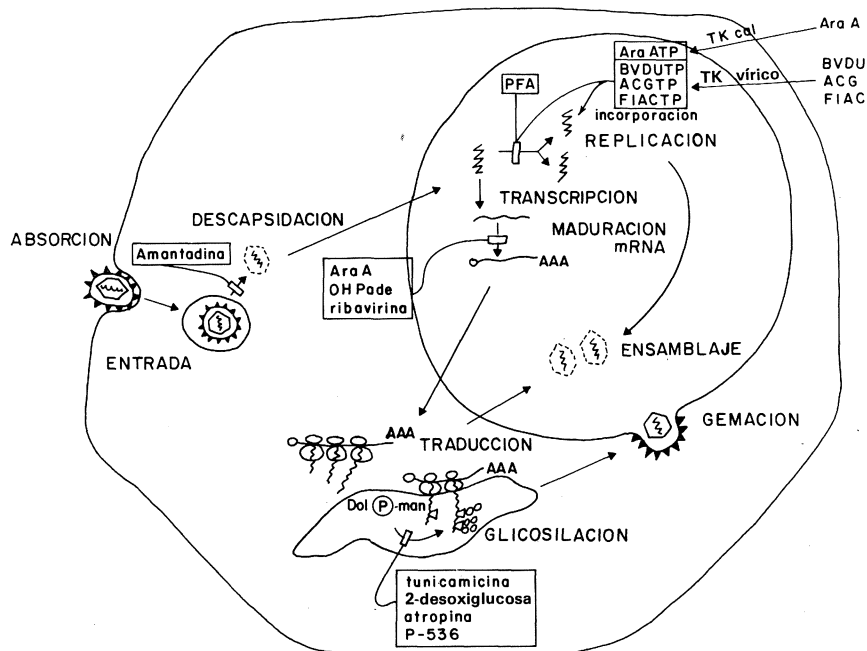


Figura 1. Ciclo replicativo de un virus y etapas inhibidas por diversos antiviricos. Se ha escogido la replicación de un herpesvirus como modelo

Ensamblaje de nuevos viriones.

Existen también diferencias entre las células normales y las infectadas que pueden ser aprovechadas para el desarrollo de antiviricos selectivos. Es el caso de las alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular que es inducida por la infección vírica (9).

3. AGENTES ANTIVÍRICOS QUE ACTÚAN CONTRA HERPESVIRUS

Desde hace dos décadas se han venido utilizando nucleósidos como la 5-iodo-2'-deoxiuridina (IDU), la trifluorotimidina o el arabinósido de citosina (ara-C) como antiherpéticos. El IDU es efectivo en el tratamiento tópico de infec-

ciones mucocutáneas por herpes simplex y de la queratitis herpética. Sin embargo, todos estos compuestos son tóxicos y carentes de selectividad, inhibiendo por igual la replicación del virus y la de las células.

En los últimos años se han sintetizado una serie de compuestos que, a una mayor actividad, unen una menor toxicidad sobre las células. Deben esta especificidad a que únicamente son fosforilados por la timidina-quinasa vírica y, por lo tanto, actúan sólo en células infectadas (aciclovir, BVDU, FIAC) y/o a que inhiben selectivamente la ADN-polimerasa vírica (aciclovir, BVDU, FIAC, PFA). La estructura de estos compuestos se muestra en la figura 2.

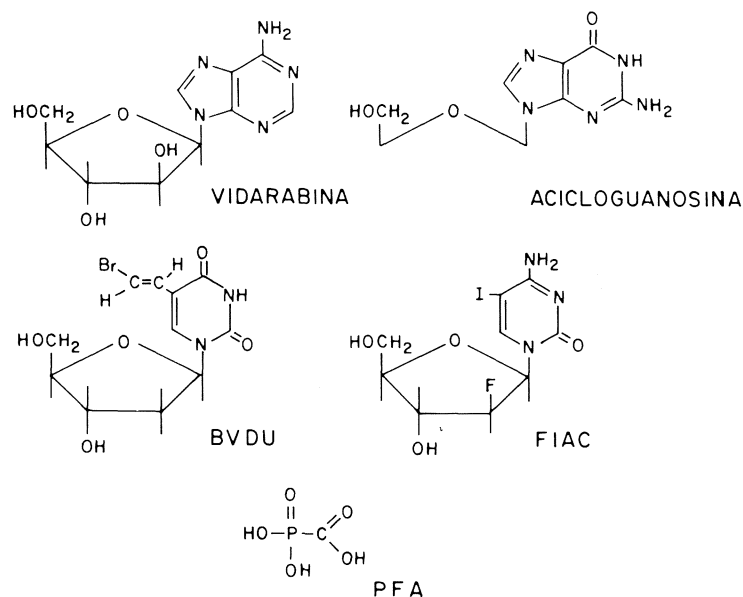


Figura 2. Estructura de algunos antiherpéticos

3.1. Vidarabina (9-β-D-arabino-furanosiladenina, ara-A) (figura 2)

Tiene actualmente un uso clínico en la terapia de la queratitis y encefalitis herpéticas y de la varicela-zóster. Muestra una cierta selectividad, inhibiendo la replicación del virus a concentraciones a las que no ocasiona toxicidad en las células no infectadas. Esto se debe a que existe una inhibición preferencial de la síntesis de DNA vírico comparada con la síntesis de DNA celular (77-78). Una vez convertido en ara-ATP inhibe las DNA-polimerasas vírica y celulares. Inhibe competitivamente la utilización del d-ATP por las DNA-polimerasas de HSV-1 y 2 (64, 67, 73). Es también, como ara-ATP, inhibidor de la ribonucleósido-difosfato-reductasa, tanto de la celu-

lar como de la codificada por HSV-1 (16). Puede incorporarse en DNA inhibiendo la polimerización posterior, habiéndose descrito que actúa como terminador de la polimerización en el DNA de HSV pero no en el celular (63). Como nucleósido es además inhibidor de la S-adenosil-L-homocisteína-hidrolasa (46).

3.2. BVDU (E)-5-bromovinil 2' desoxiuridina (figura 2)

Fue descrito como antivírico por DeClercq y cols. (23). Es un inhibidor potente de varios miembros de la familia de los herpesvirus, entre los que se encuentran el herpes simplex tipo 1, el virus de la varicela-zóster, el virus de la enfermedad de Aujeszki, el herpesvirus saimiri y el virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina. Es, sin

embargo, inactivo frente al virus de la vacuna, los virus RNA, como el virus de la estomatitis vesicular, y algunos herpesvirus, como el citomegalovirus (20).

La gran selectividad que muestra en la inhibición de los herpesvirus comparada con la toxicidad celular se debe a que el BVDU es fosforilado específicamente por la timidina-quinasa codificada por el virus, siendo un mal sustrato para la enzima celular. La especificidad del BVDU se debe, por lo tanto, a que, por un lado, es fosforilado casi exclusivamente en las células infectadas, y, por otro, a que una vez fosforilado inhibe preferentemente a la DNA-polimerasa vírica. También, una vez fosforilado, se incorpora preferentemente en el DNA de células infectadas (3), haciendo el DNA de HSV-1 más inestable (60).

El BVDU es muy activo contra el herpes simplex tipo 1 con una dosis inhibitoria 50 (ID₅₀) de 0,01 µg/ml, aunque la actividad es variable con la cepa de virus usada. Es, sin embargo, mucho menos activo contra el herpes simplex tipo 2 (23). La diferencia en actividad frente a ambos tipos de herpes simplex puede deberse a que la timidina-quinasa de HSV-1 fosforila el BVDU, no sólo a monofosfato, sino también a difosfato, mientras que la timidina-quinasa de HSV-2 lo fosforila sólo hasta monofosfato, debiendo ser fosforilado a difosfato por enzimas celulares que actuarían con menor eficacia (27). Se ha descrito también que el HSV-1 induce una desoxirribopirimidina-trifosfatasa, que es nuclear, mientras que HSV-2 induce una enzima homóloga, pero que se localiza exclusivamente en el ci-

toplasma (95), existiendo una correlación entre el nivel de la enzima en el núcleo y la sensibilidad al BVDU.

El BVDU ha demostrado ser eficaz en infecciones por HSV-1 y VZV. En el hombre se usa con éxito al 0,1 % en el tratamiento de la queratitis herpética (61). Se puede utilizar por vía oral (5-15 mg/kg día) en el tratamiento general de infecciones de mucosas por HSV-1 y VZV, en pacientes con cáncer (22).

En cuanto a su toxicidad, uno de los efectos que coaccionan la utilización de nucleósidos en clínica es la acción inmunosupresora. El BVDU, junto con la acicloguanosina, es menos mielotóxico e inmunotóxico que otros nucleósidos como la vidarabina, la trifluorotimidina y la dihidroxipropiladenina (93-94), si bien hay que puntualizar que son estudios *in vitro*.

El BVDU es quizá, junto con el FIAC, el antivírico más potente y selectivo que se conoce. Sin embargo, tiene un potencial mutagénico y carcinogénico por ser incorporado en DNA. Aunque es fosforilado e incorporado principalmente en células infectadas, esto no impide que no lo sea en menor extensión en células no infectadas. Además, no todas las células infectadas tratadas con BVDU mueren (92), pudiendo dar lugar a descendencia mutada.

3.3. Aciclovir (9-(2-hidroxietoximetil)guanina), (ACV) (figura 2)

La descripción de su actividad contra HSV-1 fue realizada primeramente por Schaeffer y cols. (75), aunque fue analizada con más de-

talle por Collins y Bauer (18). La dosis inhibitoria 50 para HSV-1 en células Vero es de $0,1 \mu\text{M}$, y para HSV-2 está entre $0,05$ y $0,14 \mu\text{M}$. Resulta más activo contra HSV-2 que el BVDU, pero menos contra HSV-1. Es también capaz de inhibir la replicación de otros herpesvirus como el VZV con una ID_{50} entre $1,25$ y $2,5 \mu\text{M}$ en células WI-38 (7). La acicloguanosina es fosforilada específicamente por la timidina-quinasa codificada por herpesvirus (29, 38). La timidina-quinasa vírica lo fosforila a acicloguanosina-monofosfato, que luego es fosforilada por una GMP-quinasa celular (62) (figura 3).

del trifosfato se incorpora en el DNA dando lugar a una terminación prematura de la replicación, al carecer de la posición $3' \text{OH}$ (36).

Se han encontrado mutantes de HSV-1 carentes de actividad timidina-quinasa resistentes a aciclovir y que no eran virulentos (33). Esto dió la esperanza de que no existieran mutantes resistentes a ACV con capacidad de producir enfermedad. Sin embargo, recientemente se han encontrado mutantes con actividad timidina-quinasa alterada, resistentes a ACV (21) y otros mutantes con una DNA-polimerasa alterada también virulen-

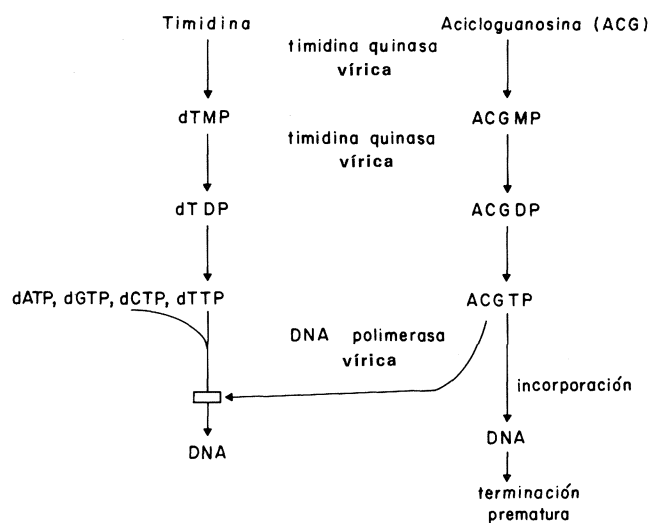


Figura 3. Ruta de incorporación de timidina en DNA. Se esquematiza también la ruta paralela de conversión del aciclovir en substratos activos

En forma trifosfatada inhibe la DNA-polimerasa vírica más que las celulares. Tiene una K_i aparente para la DNA-polimerasa vírica que es $1/30$ de la K_i para la DNA-polimerasa celular (37). A partir

tos *in vivo* (69). Estos autores encontraron que en aislados clínicos de HSV no previamente expuestos a ACV, hay mutantes ACV^r con una frecuencia de 10^{-4} .

El ACV es eficaz en dosis de

750 mg/m² d en el tratamiento de infecciones mucocutáneas por HSV-1 en pacientes inmunoincompetentes y en pacientes con herpes zóster (22).

3.4. Análogos de aciclovir

9-(4-hidroxibutil)guanina). Su actividad antiherpética fue descrita por Keller y cols. (50). La ID₅₀ para HSV-1 y HSV-2 oscila entre 2 y 14 µM. Como el aciclovir, para que sea activo, ha de ser fosforilado por la timidina-quinasa codificada por el virus. De esta forma, se han descrito mutantes de HSV-1 carentes de TK que son resistentes (55).

En estudios en animales se ha demostrado que es eficaz contra la queratitis herpética en conejos, pero no lo es contra infecciones cutáneas por HSV-1 en cobaya ni contra infecciones generales por HSV-2 en ratón (55). No obstante, hay que efectuar estudios clínicos para la evaluación de la validez de la droga.

DHPG 9-((1,3-dihidroxi-2-propoxi)metil)guanina ó 9-((2-hidroxi-1-hidroximetil)etoxi)metil) guanina ó 2' nor 2' desoxiguanosina. Ha sido sintetizado recientemente (80). Inhibe a varios herpesvirus: herpes simplex tipos 1 y 2, citomegalovirus y virus de Epstein-Barr, siendo 10 veces más potente que el aciclovir (17, 34). Es también más activo que el aciclovir contra el virus de la enfermedad de Aujeszky y 230 veces más activo contra el herpesvirus equino (74).

Su actividad es dependiente de la fosforilación por la timidina-quinasa vírica, siendo mejor sustrato que el aciclovir (17, 34). Un aspecto importante es que mantiene la actividad contra variantes

de HSV-1 con la timidina-quinasa o las DNA-polimerasas alteradas que son resistentes a aciclovir (17).

3.5. FIAC 2' fluoro-5-iodo-1-β-D-arabinofuranosilcitosina (figura 2)

Su actividad depende de que sea fosforilado por la timidina-quinasa de los herpesvirus (59, 90). El derivado fosforilado (FIACTP) interfiere con la DNA-polimerasa vírica (3) y se incorpora en DNA. El FIACTP puede dar lugar a metabolitos trifosfatados también activos. Se ha descrito su actividad terapéutica y la del análogo de timina en ratones infectados intracerebralmente con HSV-1 (76) siendo más activo que el aciclovir y que la vidarabina.

3.6. Fosfonoformiato (figura 2)

Interacciona con la DNA-polimerasa vírica en el sitio de unión para el pirofosfato, actuando como inhibidor no competitivo (43, 58). Es activo contra el herpes simplex tipos 1 y 2, contra el herpesvirus de la enfermedad de Marek, contra el virus de la rinotraqueitis infecciosa y el de la enfermedad de Aujeszky. No es activo contra el virus del sarampión, de la gripe, polio, rabia y visna. Es eficaz contra HSV-1 por aplicación tópica (1). Inhibe la síntesis de DNA en células infectadas por HSV-1 (56). Inhibe también, preferentemente, la DNA-polimerasa de retrovirus y del virus de la hepatitis B comparado con las polimerasas celulares (42, 86). También es inhibidor de la transcriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (31).

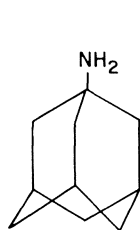
4. COMPUESTOS ACTIVOS CONTRA VIRUS RESPIRATORIOS RNA

4.1. Derivados del adamantano

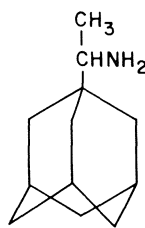
Amantadina (figura 4). Se han hecho muchos estudios en humanos para el tratamiento y profilaxis de la gripe mediante la administración de amantadina, llegando a conseguirse un 70% de protección (68). Resulta adecuada pa-

ra el tratamiento de los estadios tempranos de la infección por virus de la gripe del tipo A cuando se administra oralmente a 200 mg/d, aunque la aplicación intranasal da mejores resultados.

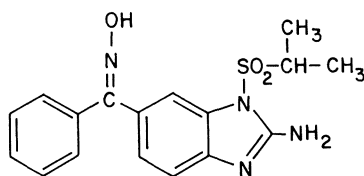
En cuanto al modo de acción, se sabe que actúa en etapas tempranas de la replicación (70). Se ha establecido que la amantadina es un agente lisosomotrópico que incrementa el pH de los lisosomas e in-



AMANTADINA



RIMANTADINA



ENVIROXIME

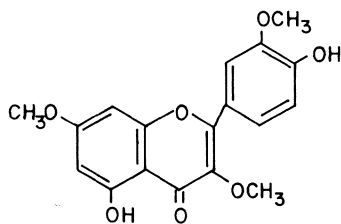
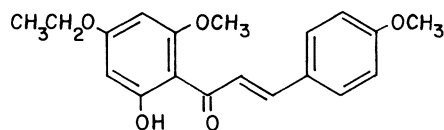
R₀ 09-0179R₀ 09-0410

Figura 4. Compuestos inhibidores de la replicación de virus RNA

pide la descapsidación de los virus de forma similar a como actúan la cloroquina y el cloruro amónico (41) (figura 5).

hace 3 décadas (88). El 2-(α -hidroxibencil)bencimidazol (HBB) fue una de las primeras drogas capaces de inhibir la multiplicación de

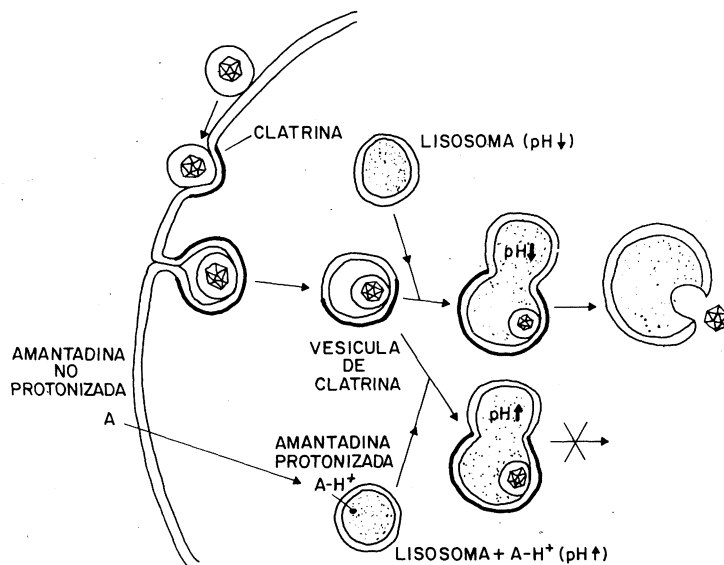


Figura 5. Proceso de entrada de un virus con envuelta a través de la formación de lisosomas secundarios. Inhibición por la amantadina mediante incremento del pH de las vesículas

Rimantadina (α -metil-1-adamantan metilamina) (figura 4). Es menos tóxica que la amantadina (47), y es también clínicamente superior en la profilaxis de la gripe del tipo A. Dosis de 150 mg/d en los estados tempranos de la infección gripal, bajan la fiebre y el tiempo de pirexia. Se ha usado con éxito en epidemias de gripe por administración oral o por aerosol (40, 47). Se requiere en tiempos tempranos de la infección para que mantenga la actividad, inhibiendo la transcripción temprana del RNA (47).

4.2. Bencimidazoles

La actividad antivírica de los bencimidazoles es conocida desde

virus sin un efecto tóxico sobre las células (89). El HBB es principalmente activo contra los enterovirus (familia picornavirus). Parece ser que actúa inhibiendo la replicación del RNA vírico en una etapa temprana (28).

Más recientemente, se ha descrito un nuevo bencimidazol como un potente inhibidor de la replicación de rinovirus, el enviroxime (2-amino-1-(isopropil sulfonil)-6-bencimidazolfenilcetona oxima) (25) (figura 4). Es capaz de inhibir varias cepas de rinovirus. Esta inhibición es, al menos, de 3 unidades logarítmicas a 0,5 μ g/ml. Combinado con la guanidina previene la muerte de ratones infectados con virus Coxsackie (44-45).

4.3. Flavonoides

El Ro09-0179 (4',5-dihidroxi-3,3',7-trimetoxiflavona) (figura 4), actúa inhibiendo la replicación de picornavirus entre la descapsidación y la síntesis de RNA (49). El Ro09-0410 (figura 4) (4'-etoxi-2'-hidroxi-4,6'-dimetoxichalcona) es también un potente agente antirrinovirus, pero actúa inactivando el virus, no la entrada del mismo (48).

El 4',6'dicloroflavan es el inhibidor más potente de rinovirus, pero recientemente se ha visto que no es eficaz por tratamiento oral (71).

5. AGENTES ANTIVÍRICOS DE AMPLIO ESPECTRO

5.1. Ribavirina (1- β -ribofuranosil, 1,2,4triazol, 3 carboxamido) (figura 6)

Fue establecida como un agente capaz de inhibir la replicación de virus tanto RNA como DNA (79). *In vitro* todos los virus son virtualmente sensibles, aunque en diverso grado. Los ortomixovirus, paramixovirus y miembros de la familia de los herpesvirus son los más sensibles; los picornavirus son los

menos. *In vivo* es eficaz contra virus que contienen DNA, como los herpesvirus y los poxvirus, presentando poca actividad contra los papovavirus y casi nada contra adeno y parvovirus (virus DNA). También es activo contra virus que contienen RNA como arenavirus, bunyavirus, coronavirus, ortomixovirus, paramixovirus y retrovirus y poco contra picornavirus, rabdovirus, reovirus y togavirus (virus RNA) (5, 84). Es interesante la posible aplicación de la ribavirina en el tratamiento de la fiebre de Lassa (83) y de enfermedades con posible etiología viral, como el lupus eritematoso (82). En pruebas, en humanos, ha mostrado actividad contra la hepatitis A y la forma aguda de la hepatitis B, contra herpes zóster y contra infecciones del área orofacial por HSV-1 y genital por HSV-2 (81).

En cuanto al mecanismo de acción, parece que actúa en dos sitios distintos: por un lado inhibe competitivamente a la IMP-deshidrogenasa en forma de ribavirina-trifosfato. Es fosforilada a ribavirina-monofosfato por la adenosina-quinasa. Sin embargo, un análogo, el 1,4,5 triazol,3carboxamido, es un inhibidor tan potente de la IMP-deshidrogenasa como la riba-

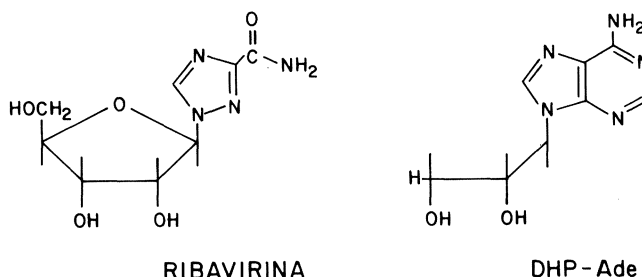


Figura 6. Estructura de algunos antivíricos de amplio espectro

virina y no tiene acción antivírica, y viceversa, los tiocarboxamido y carboxamidino derivados tienen actividad antivírica, pero no inhiben la IMP-deshidrogenasa. Por otro lado, la ribavirina-trifosfato inhibe competitivamente la guanilación del extremo 5' de los mRNA (formación del cap) (81).

5.2. DHP-Ade (s)-9-(2,3-dihidroxipropiladenina) (figura 6)

Es activo contra virus tanto DNA como RNA (24), aunque es más tóxico que el aciclovir, BVDU y araA, ya que afecta al sistema inmune (93). En cuanto a su modo de acción, parece que produce un bloqueo de la S-adenosilhomocisteína-hidrolasa, ocasionando una inhibición de la metilación de los mRNA víricos (22).

En ratones reduce en un 50 % la mortalidad ocasionada por administración intranasal de VSV (24).

5.3. Inhibidores de glicosilación

Se ha demostrado que las glicoproteínas de los virus juegan un papel importante en la extensión y patogenicidad de la infección, interviniendo en la absorción o en la entrada de los virus en las células. La inhibición de la formación de glicoproteínas víricas con inhibidores específicos (como tunicamicina, 2-desoxiglucosa, y glucosamina) (figura 7) origina una producción defectiva de viriones (51, 87). La inhibición de la glicosilación afecta de forma distinta a cada virus, así la proteína de la envuelta del virus de la peste aviar es degradada por proteasas celulares si no está glicosilada adecuada-

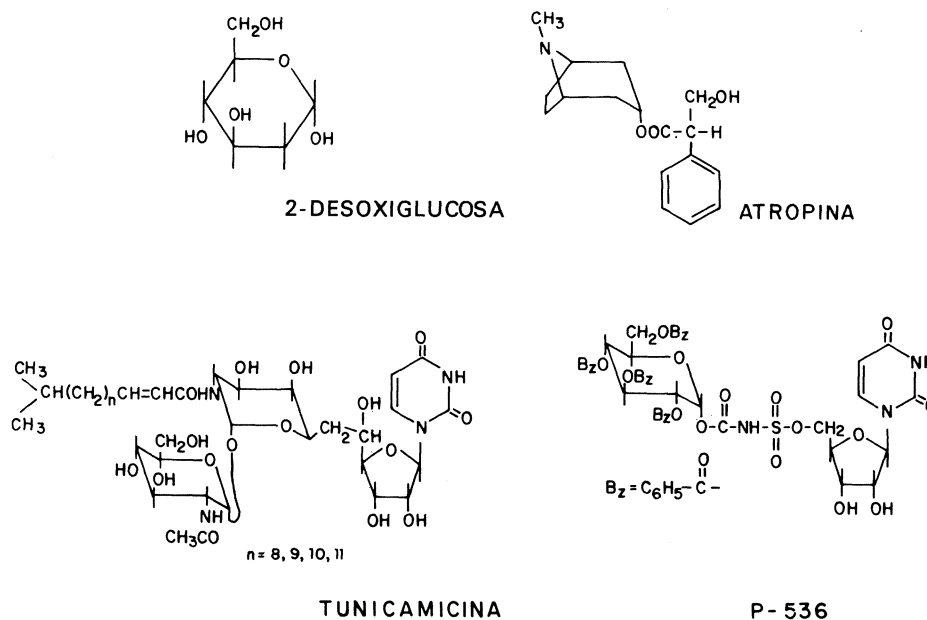


Figura 7. Fórmulas de inhibidores de glicosilación

mente y el virus no llega a salir de la célula (77). La proteína G del virus de la estomatitis vesicular cuando no está glicosilada, no es transportada a la membrana y no se libera el virus de la célula (87). Con inhibidores de glicosilación se forman viriones de HSV-1, pero no son infectivos (87).

La tunicamicina inhibe competitivamente la transferencia de fosforil-N-acetilglucosamina desde UDP-N-acetil-glucosamina al dolicol-fosfato. Impide, por lo tanto, la formación de N-acetilglucosaminilpirofosfordolicol, que es un intermediario en la transferencia de azúcares a las proteínas (57) (figura 8). El modo de acción de la 2-de-

rildolicol. También se incorpora en lugar de la glucosa y manosa en dolicololigosacáridos.

Recientemente hemos encontrado una serie de compuestos con actividad antiherpética que inhiben la glicosilación de proteínas a concentraciones que no afectan a la síntesis de proteínas: son la atropina y los análogos de UDP-hexosa, como el P-536, sintetizados por F. de las Heras y col. (figura 7).

Se ha estudiado poco la utilización de inhibidores de glicosilación como antivíricos *in vivo*. La 2-desoxiglucosa es efectiva en la prevención o mejora de la queratitis herpética (72). También se ha

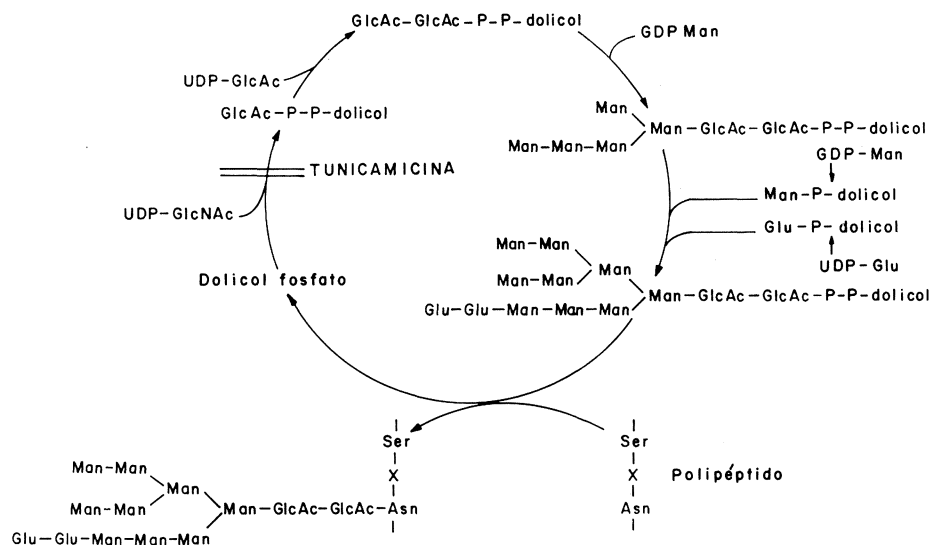


Figura 8. Biosíntesis de glicoproteínas con oligosacáridos unidos por enlace N-glicosídico y sitio de acción de la tunicamicina. La ruta está mediada por el dolicolfosfato. GlcAc, N-acetil glucosamina; Man, manosa; Glu, glucosa

soxiglucosa es más complejo. Actúa como un análogo de manosa inhibiendo la formación de glucosilfosfordolicol y manosilfosfo-

descrito su utilidad en el tratamiento de infecciones genitales por herpes en humanos, con un 90 % de curaciones (8).

Figura 9. Estructura química de algunos antibióticos selectivamente permeables en células infectadas por virus

san fácilmente la membrana de las células normales y sí lo hacen cuando esta membrana se modifica mediante un virus o mediante algún otro procedimiento que afecte a la integridad de la membrana. Los mecanismos moleculares mediante los cuales la absorción vírica promueve la entrada de estas macromoléculas, no están aún aclarados, pero al menos, en el caso de algunos virus, el paso de estos inhibidores pudiera se-

guir la ruta indicada en la *figura 10*.

Permeabilidad tardía. En cuanto a la permeabilización que se observa en tiempos tardíos de la infección, parece que está ligada a la alteración de la membrana mediante la inserción de proteínas víricas; esto desestabiliza la integridad de la membrana y aumenta la permeabilidad a diversos iones, metabolitos e inhibidores.

La mayoría de estos estudios

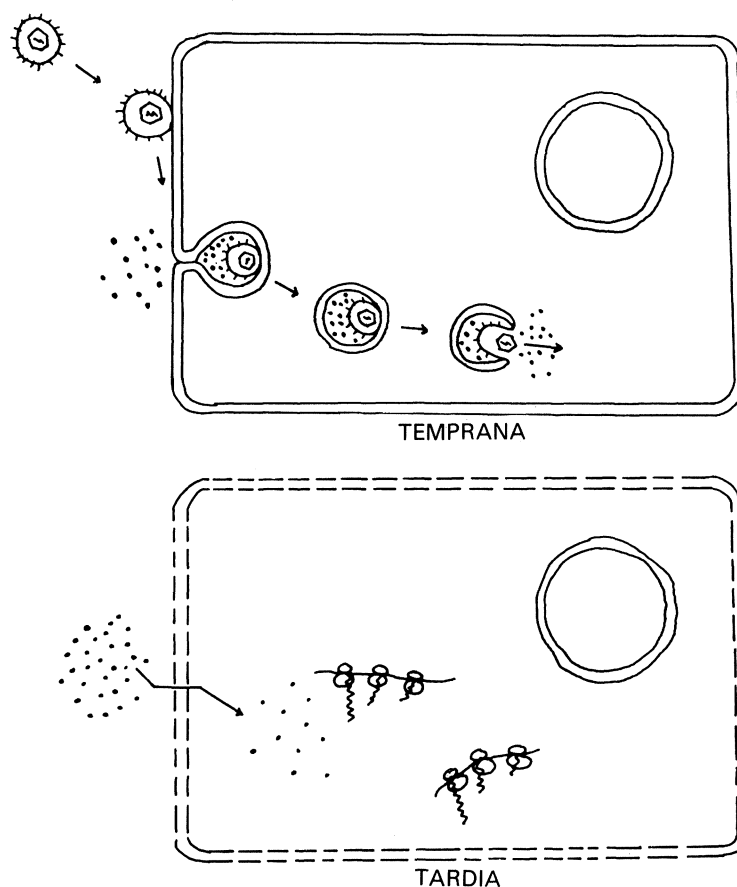


Figura 10. Modelo de permeabilización temprana y tardía en el desarrollo de un virus. La permeabilización temprana está provocada por la entrada del virus. La permeabilización tardía necesita de la expresión del genoma vírico

sobre cambios de permeabilidad durante la infección vírica, se llevaron a cabo inicialmente con células infectadas con picornavirus (9); sin embargo, poco después, se comprobó que estos cambios de permeabilidad, tanto tempranos como tardíos, ocurrían con la gran mayoría de los virus ensayados, conteniendo como genoma tanto DNA como RNA, e independientemente de que tengan o no cubierta lipídica (6, 12).

La acción antivírica de estos compuestos en cultivos celulares se observa a concentraciones que no son tóxicas para las células (53), pero aún queda sin demostrar la posible utilidad de estos inhibidores como agentes antivíricos en animales.

5.5. Interferones

Los interferones (IFN) son una familia de proteínas celulares que se sintetizan en respuesta a determinados inductores (35, 85). Aunque todavía no se conocen muy bien los mecanismos de esta inducción, parece que después del estímulo inicial existe una desrepresión de genes a nivel del DNA y se sintetizan los mRNAs que codifican para los interferones. La traducción de estos mRNAs en el citoplasma da lugar a la proteína-interferón que se excreta al medio externo. Se conocen tres clases principales de interferones, que se distinguen por el tipo celular que los sintetiza y el tipo de inductor empleado (52). El interferón α se sintetiza por los linfocitos en respuesta a virus inactivados. En el hombre existen entre 8 a 12 genes distintos que codifican para distintas moléculas de IFN- α que

difieren en su estructura primaria. Existen también varios genes de IFN- β , sintetizado por fibroblastos en respuesta a un estímulo vírico. Por último, el IFN- γ también conocido como interferón inmune, es sintetizado por los linfocitos en respuesta a un antígeno o a un mitógeno (26).

La interacción de la molécula interferón con la célula apropiada induce toda una serie de efectos (*figura 11*). Entre ellos, la acción antivírica y antiproliferativa han sido los más estudiados, debido, en parte, a su gran interés clínico. La acción antiproliferativa del interferón y su uso como agente anticancerígeno, han sido ampliamente documentadas y muchos de estos resultados se recogen en un libro reciente (26). Baste decir aquí, únicamente, que el interferón ha demostrado su eficacia frente a un gran número de enfermedades neoplásicas, mientras que en algunos otros cánceres, como el de colon o el de pulmón, no ha mostrado actividad.

En cuanto a la acción antivírica del interferón, se sabe que, una vez que éste interacciona con el receptor apropiado, induce el llamado estado antivírico, de manera que ahora el desarrollo de una gran variedad de virus está inhibido en esas células (15). La base molecular del estado antivírico permanece aún inexplicada. Aunque se ha invocado que la inhibición de la síntesis de proteínas víricas se haría mediante dos sistemas, el sistema del 2'-5' (A) o la vía de la proteína-quinasa, que fosforilaría a algún factor de iniciación, aún no han podido probarse estos mecanismos en ningún sistema utilizando células en cultivo (65, 66).

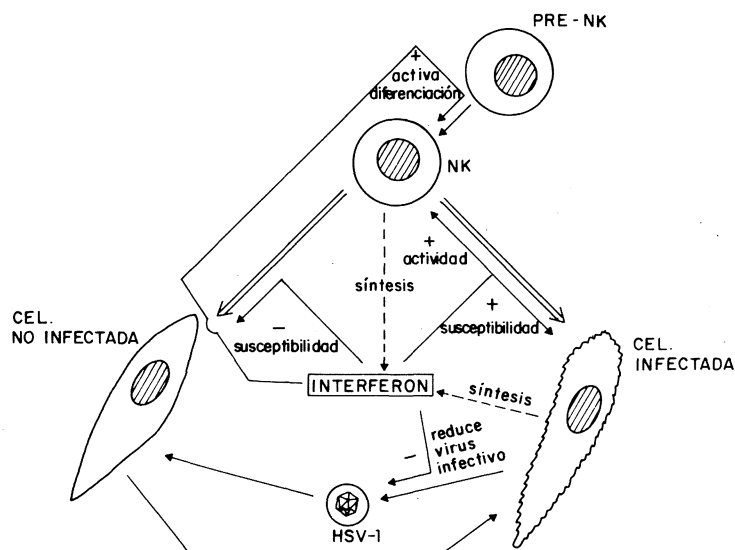


Figura 11. Esquema global de la acción del interferón sobre la replicación del virus herpes simplex tipo 1. Consiste en una inhibición directa de la producción de partículas infecciosas y en una estimulación de la actividad NK contra las células infectadas

Los resultados del uso clínico del interferón como agente antivírico indican que tiene un claro efecto curativo frente a las verrugas de la piel, el *Condylomata acuminata* y la papilomatosis de la laringe. También pudiera tener un efecto contra la hepatitis y el catarro común (26). En otros casos, como en algunas enfermedades causadas por herpes virus, el interferon puede resultar eficaz en combinación con otros agentes antivíricos (30). Esta es una de las tendencias de más interés hoy en día en el campo de los agentes antivíricos, es decir, buscar sinergismos entre el interferón humano, a dosis que resulten muy poco tóxicas, y otros agentes cuya eficacia, cuando se administran por sí solos, no sea muy alta.

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Aunque aún no se ha encontrado la panacea dentro de los agentes antivíricos, parece claro que los compuestos descubiertos en los últimos años, la segunda generación de antivíricos, son mucho menos tóxicos y de una alta actividad antivírica. Esto ha hecho desaparecer la creencia generalizada de que los virus y las infecciones que produzcan no son atacables selectivamente. Está claro que cuanto mejor se conozca la biología molecular de un virus y los sucesos que son propios de la infección vírica, existirán más posibilidades de encontrar inhibidores específicos para cada una de las etapas replicativas.

Hemos de recordar que, en este momento, la mayoría de los agentes antiherpéticos son análogos de nucleósidos y basan su acción en el reconocimiento selectivo por la timidina-quinasa codificada por el virus. También sería muy deseable poseer en un futuro, no sólo mejores compuestos antiherpéticos, sino también agentes antivíricos que sean efectivos contra la gripe, el catarro y la hepatitis, ya que, por el momento, la terapia de estas enfermedades se encuentra en sus albores. No sólo el descubrimiento de nuevos compuestos efectivos contra los virus, sino también el mejor conocimiento del modo de acción de los ya existentes, puede llevarnos a descubrir sinergismos entre ellos y a utilizar combinaciones de compuestos altamente selectivos, que impidan, además, en lo posible, la aparición de mutantes resistentes y que por otra parte no sean tóxicos. Esta meta está ya muy cerca de alcanzarse dentro del campo de los compuestos antivíricos.

Agradecimientos. Queremos mostrar nuestro agradecimiento a Esperanza Rodríguez por mecanografiar este manuscrito y a la CAICYT por la ayuda económica Plan Concertado 41/82. Antibióticos S.A. B. A. es becario del CSIC.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. ALENIUS, S.; DINTER, Z., and ÖBERG, B. 1978. Therapeutic effect of trisodium phosphonoformate on cutaneous herpesvirus infection in Guinea pigs. *Antimicrob. Chemother.*, 14, 408-13.
2. ALLAUDEEN, H. S.; CHEN, M. S.; LEE, J. J.; DECLECO, E., and PRUSOFF, W. H. 1982. Incorporation of E-5-(2-halovinyl)-2'-deoxyuridines into deoxyribonucleic acids of herpes simplex virus type 1-infected cells. *J. Biol. Chem.*, 257, 603-6.
3. ALLAUDEEN, H. S.; DESCAMPS, J.; SEHGAL, R. K., and FOX, J. J. 1982. Selective inhibition of DNA replication in herpes simplex virus infected cells by 1-(2'-deoxy-2'-fluoro-β-D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine. *J. Biol. Chem.*, 257, 11879-82.
4. ALLAUDEEN, H. S.; KOZARICH, J. W.; BERTINO, J. R., and DECLECO, E. 1981. On the mechanism of selective inhibition of herpesvirus replication by (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 78, 2698-702.
5. ALLEN, L. B. 1980. Review of *in vivo* efficacy of ribavirin. En: R. A. SMITH and W. KIRKPATRICK (ed.). *Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent*, 43-58. Academic Press, London, New York.
6. BENEDETTO, A.; ROSSI, G. B.; AMICI, C.; BELARDELLI, F.; CIOÉ, L.; CARRUBA, G., and CARRASCO L. 1980. Inhibition of animal virus production by means of translation inhibitors unable to penetrate normal cells. *Virology*, 106, 123-32.
7. BIRON, K. K., and ELION, G. B. 1979. Sensitivity of varicella zoster virus *in vitro* to acyclovir. 19th. Interscience Conf. Antimicrob. Ag. Chemother, Abstr. 249.
8. BLOUGH, H. A., and GIUNTOLI, R. L. 1979. Successful treatment of human genital herpes infections with 2-deoxy-D-glucose. *J. Amer. Med. Ass.*, 241, 2798-801.
9. CARRASCO, L. 1978. Membrane leakiness after viral infection and a new approach to the development of antiviral agents. *Nature*, 272, 694-99.
10. CARRASCO, L. 1979. The development of new antiviral agents based on virus-mediated cell modification. En: P. CHANDRA (ed.). *Antiviral Mechanisms for the Control of Neoplasia*, 623-31. Plenum Press, New York.
11. CARRASCO, L. 1981. Modification of membrane permeability induced by animal viruses early in infection. *Virology*, 113, 623-29.
12. CARRASCO, L., and ESTEBAN, M. 1982. Modification of membrane permeability in vaccinia virus-infected cells. *Virology*, 117, 62-9.
13. CARRASCO, L., and LACAL, J. C. 1983. Permeabilization of cells during ani-

- mal virus infection. *Pharmacol. Ther.*, 23, 109-45.
14. CARRASCO, L., and SMITH, A. E. 1980. Molecular biology of animal virus infection. *Pharmacol. Ther.*, 9, 311-55.
 15. CARRASCO, L., and VÁZQUEZ, D. 1983. Viral translation inhibitors. En: F. F. HAHN (ed.). *Antibiotics*, VI, 279-95. Springer-Verlag, Berlín.
 16. CHANG, C. H., and CHENG, Y. C. 1980. Effects of deoxyadenosine triphosphate and 9- β -D-arabinofuranosyl-adenine5'-triphosphate on human ribonucleotide-reductase from Molt-4F Cells and the concept of Self-potentiation. *Cancer Res.*, 40, 3555.
 17. CHENG, Y. C.; HUANG, E. S.; LIN, J. C.; MAR, E. C.; PAGANO, J. S.; DUTSCHMAN, G. E., and GRILL, S. P. 1983. Unique spectrum of activity of 9-((1,3-dihydroxy-2-propoxy)methyl)guanine against herpesviruses *in vitro* and its mode of action against herpes simplex virus type 1. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 80, 2767-70.
 18. COLLINS, P., and BAUER, D. J. 1979. The activity *in vitro* against herpes virus of 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine (acycloguanosine), a new antiviral agent. *Antimicrob. Chemother.*, 5, 431-36.
 19. CONTRERAS, A., and CARRASCO, L. 1979. Selective inhibition of protein synthesis in virus-infected mammalian cells. *J. Virol.*, 29, 114-22.
 20. CRUMPACKER, C. S.; SCHNIFFER, L. E.; ZAIA, J. A., and LEVIN, M. J. 1979. Growth inhibition by acycloguanosine of herpes viruses isolated from human infections. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 15, 642-45.
 21. DARBY, G.; FIELD, H. J., and SALISBURY, S. A. 1981. Altered substrate specificity of herpes simplex virus thymidine kinase confers acyclovir resistance. *Nature*, 289, 81-3.
 22. DECLERCO, E. 1982. Specific targets for antiviral drugs. *Biochem. J.*, 205, 1-13.
 23. DECLERCO, E.; DESCAMPS, J.; DE SOMER, P.; BARR, P. J.; JONES, A. S., and WALKER, R. T. 1979. (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine: a potent and selective anti-herpes agent. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 76, 2947-51.
 24. DECLERCO, E.; DESCAMPS, J.; DE SOMER, P., and HOLY, A. 1978. (S)-9-(2,3 dihydroxypropyl)adenine: An aliphatic nucleoside analog with broad-spectrum antiviral activity, *Science*, 200, 563-65.
 25. DELONG, D. C., and REED, S. E. 1980. Inhibition of rhinovirus replication in organ cell culture by a potential antiviral drug. *J. Infect. Dis.*, 141, 87-91.
 26. DE MAYER, E., and SCHELLEKENS, H. (ed.). 1983. *The Biology of the Interferon System*. Elsevier Sci. Pub., Amsterdam.
 27. DESCAMPS, J., and DECLERCO, E. 1981. Specific phosphorylation of E-5-(2-iodovinyl)-2'-deoxyuridine by herpes simplex virus-infected cells. *J. Biol. Chem.*, 256, 5975-76.
 28. EGGERS, H. J. 1984. Antiviral action of 2-(α -hydroxybenzyl) benzimidazole (HBB). En: E. DECLERCO and R. T. WALKER (ed.). *Targets for the Design of Antiviral Agents*. 177-88. Plenum Press, New York.
 29. ELION, G. B.; FURMAN, P. A.; FYFE, J. A.; DE MIRANDA, P.; BEAUCHAME, L., and SCHAEFFER, H. J. 1977. Selectivity of action of an antiherpetic agent 9-(2-hydroxyethoxy methyl)guanine. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 74, 5716-20.
 30. EPPSTEIN, D. A., and MARSH, Y. V. 1984. Potent synergistic inhibition of herpes simplex virus-2 by 9-((1,3-dihydroxy-2-propoxy) methyl) guanine in combination with recombinant interferons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 120, 66-73.
 31. ERICKSSON, B.; STENNING, G., and ÖBERG, B. 1982. Inhibition of reverse transcriptase activity of avian myeloblastosis virus by pyrophosphate analogues. *Antiviral Res.*, 2, 81-95.
 32. FERNÁNDEZ-PUENTES, C., and CARRASCO, L. 1980. Viral infection permeabilizes mammalian cells to protein toxins. *Cell*, 20, 769-75.
 33. FIELD, H. J.; DARBY, G. K., and WILDY, P. 1979. Pathogenicity for mice of acycloguanosine-resistant mutants of herpes simplex virus. 19th. Interscience Conf. Antimicrob. Ag. Chemother., Abstr. 257.
 34. FIELD, A. K.; DAVIES, M. E.; DESWITT, C.; PERRY, H. C.; LIOU, R.; GERMERSHAUSEN, J.; KARKAS, J. D.; ASHTON, W. T.; JOHNSTON, D. B. R., and TOLMAN, R. L. 1983. 9-((2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy)methyl)guanine: A selective inhibitor of herpes group virus replication. *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 80, 4139-43.
 35. FRIEDMAN, R. M. 1977. Antiviral activity of interferon. *Bacteriol. Rev.*, 41, 543-67.
 36. FURMAN, P. A.; MCGUIRT, P. V.; KELLER,

- P. M.; FYFE, J. A., and ELION, G. B. 1980. Inhibition by acyclovir of cell growth and DNA synthesis of cells biochemically transformed with herpesvirus genetic information. *Virology*, 102, 420-30.
37. FURMAN, P. A.; ST. CLAIR, M. H.; FYFE, J. A.; RIDEOUT, J. L.; KELLER, P. M., and ELION, G. B. 1979. Inhibition of herpes simplex virus-induced DNA polymerase activity and viral DNA replication by 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine and its triphosphate. *J. Virol.*, 32, 72-77.
38. FYFE, J. A.; KELLER, P. M.; FURMAN, P. A.; MILLER, R. L., and ELION, G. B. 1978. Thymidine kinase from herpes simplex virus phosphorylates the new antiviral compound, 9-(2-hydroxyethoxymethyl)guanine. *J. Biol. Chem.*, 253, 8721-27.
39. GRUNERT, R. R. 1979. Search for antiviral agents. *Annu. Rev. Microbiol.*, 33, 335.
40. HAYDEN, F. G.; ZYLIDNIKOV, D. M.; IL-JENKO, V. I., and PADOLKA, Y. V. 1982. Comparative therapeutic effect of aerosolized and oral rimantadine HCl in experimental human influenza A virus infection. *Antiviral Res.*, 2, 147-53.
41. HELENIUS, A.; KARTENBECK, J.; SIMONS, K., and FRIES, E. 1980. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *J. Cell Biol.*, 84, 404-20.
42. HELGSTRAND, E.; ERIKSSON, B.; JOHANSSON, N. G.; LANNERÖ, B.; LARSSON, A.; MISIORNY, A.; NOREN, J. O.; SJÖBERG, B.; STENBERG, K.; STENING, G.; STRIDH, S.; ÖBERG, B.; ALENIUS, S., and PHILIPSON, L. 1978. Trisodium phosphonoformate, a new antiviral compound. *Science*, 201, 819-21.
43. HELGSTRAND, E.; FLODTH, H.; LERNESTEDT, J.; LUNDSTROM, J., and ÖBERG, B. 1980. Trisodium phosphoformate: Antiviral activities, safety evaluation and preliminary clinical results. En: L. COLLIER, and J. S. OXFORD (ed.). *Developments in Antiviral Therapy*. Academic Press, London, New York.
44. HERMANN, E. C. (Jr.); HERMANN, J. A. and DELONG, D. C. 1981. Comparison of the antiviral effects of substituted benzimidazoles and guanine *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.*, 1, 301-14.
45. HERMAN, E. C. (Jr.); HERMANN, J. A., and DELONG, D. C. 1982. Prevention of death in mice infected with coxsackievirus A16 using guanidine HCl mixed with substituted benzimidazoles. *Antiviral Res.*, 2, 339-46.
46. HERSHFELD, M. S. 1979. Apparent suicide inactivation of human lymphoblast S-adenosyl homocysteine hydrolase by 2'-deoxyadenosine and adenine arabinoside. *J. Biol. Chem.*, 254, 22-25.
47. INDULEN, M. K., and KALNINYA, V. A. 1980. Studies on the antiviral effect and the mode of action of the anti-influenza compound rimantadine. En: L. H. COLLIER and J. S. OXFORD (ed.). *Developments in Antiviral Therapy*. Academic Press, London, New York.
48. ISHITSUKA, H.; NINOMIYA, Y.; OHSAWA, C.; FUJII, M., and SUHARA, Y. 1982. Direct and specific inactivation of rhinovirus by chalcone Ro 09-0410. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 22, 617-21.
49. ISHITSUKA, H.; OHSAWA, C.; OHIVA, T.; UMEDA, I., and SUHARA, Y. 1982. Antipicornavirus flavone Ro 09-0179. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 22, 611-16.
50. KELLER, P. M.; FYFE, J. A.; BEAUCHAMP, L.; LUBBERS, C. M.; FURMAN, P. A.; SCHAEFFER, H. J., and ELION, G. B. 1981. Enzymatic phosphorylation of acyclic nucleoside analogs and correlations with antiherpetic activities. *Biochem. Pharmacol.*, 30, 3071-77.
51. KLENK, H. D., and SCHWARZ, R. T. 1982. Viral glycoprotein metabolism as a target for antiviral substances. *Antiviral Res.*, 2, 177-90.
52. KNIGHT, E. K. 1980. Purification and characterization of interferons. En: I. GRESSER (ed.). *Interferon 2*. Academic Press, London, New York.
53. LACAL, J. C., and CARRASCO, L. 1983. Antiviral effects of hygromycin B, a translation inhibitor nonpermeant to uninfected cells. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24, 273-75.
54. LACAL, J. C.; VÁZQUEZ, D.; FERNÁNDEZ-SOUSA, J. M., and CARRASCO, L. 1980. Antibiotics that specifically block translation in virus-infected cells. *J. Antibiot.*, 33, 441-47.
55. LARSSON, A.; ALENIUS, S.; JOHANSSON, N. G., and ÖBERG, B. 1983. Antiherpetic activity and mechanism of action of 9-(4-hydroxybutyl) guanine. *Antiviral Res.*, 77-86.
56. LARSSON, A., and ÖBERG, B. 1981. Selective inhibition of herpesvirus DNA synthesis by foscarnet. *Antiviral Res.*, 1, 55-62.
57. LEHLE, L., and TANNER, W. 1976. The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-

- acetylglucosamine derivatives. FEBS Lett., 71, 167-70.
58. LEINBACH, S. S.; RENO, J. M.; LEE, IS-BELL, A. F., and BOEZI, J. A. 1976. Mechanism of phosphonoacetate inhibition of herpesvirus-induced DNA polymerase. *Biochemistry*, 15, 426-30.
 59. LÓPEZ, C.; WATANABE, K. A., and FOX, J. J. 1980. 2'-fluoro-5-iodoaracytosine, a potent and selective antiherpesvirus agent. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 17, 803-06.
 60. MANCINI, W. R.; DECLERCO, E., and PRUSSOFF, W. H. 1983. The relationship between incorporation of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine into herpes simplex virus type 1 DNA with virus infectivity and DNA integrity. *J. Biol. Chem.*, 258, 792-95.
 61. MAUDGAL, P. C.; DECLERCO, E.; DESCAMPS, J.; MISSOTTEN, L.; DE SOMER, P.; BUSSON, R.; VANDERHAEGHE, H.; VERHELST, G.; WALKER, R. T., and JONES, A. S. 1980. (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine in the treatment of experimental herpes simplex keratitis. *Antimicrob. Chemother.*, 17, 8-12.
 62. MILLER, W. H., and MILLER, P. L. 1980. Phosphorylation of acyclovir (acycloguanosine) monophosphate by GMP kinase. *J. Biol. Chem.*, 255, 7204-07.
 63. MÜLLER, W. E. G.; ZAHN, R. K.; BEYER, R., and FALKE, D. 1977. 9- β -arabinofuranosyladenine as a tool to study herpes simplex virus DNA replication *in vitro*. *Virology*, 76, 787-96.
 64. MÜLLER, W. E. G.; ZAHN, R. K., and FALKE, D. 1978. Variation of DNA polymerase and RNA polymerase activities in cells infected with herpes simplex virus type 1. *Virology*, 84, 320-30.
 65. MUÑOZ, A., and CARRASCO, L. 1983. Effect of interferon treatment on blockade of protein synthesis induced by poliovirus infection. *Eur. J. Biochem.*, 137, 623-29.
 66. MUÑOZ, A., and CARRASCO, L. 1984. Action of human lymphoblastoid interferon on HeLa cells infected with RNA-containing animal viruses. *J. Gen. Virol.*, 65, 377-90.
 67. OSTRANDER, M., and CHENG, Y. C. 1980. Properties of herpes simplex virus type 1 and type 2 DNA-polymerase. *Bioch Biophys. Acta*, 609, 232-45.
 68. OXFORD, J. S., and GALBRAIGHT, A. 1980. Antiviral activity of amantadine: a review of laboratory and clinical data. *Pharmacol. Ther.*, 11, 181.
 69. PARRIS, D. S., and HARRINGTON, J. E. 1982. Herpes simplex virus variants resistant to high concentrations of acyclovir exist in clinical isolates. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 22, 71-7.
 70. PATTERSON, S.; OXFORD, J. S., and DOUMASHKIN, R. R. 1979. Studies on the mechanism of influenza virus entry into cells. *J. Gen. Virol.*, 43, 223-29.
 71. PHILLPOTTS, R. J.; WALLACE, J.; TYRRELL, D. A.J.; FREESTONE, D. S., and SHEPHERD, W. M. 1983. Failure of oral 4',6-dichloroflavan to protect against rhinovirus infection in man. *Arch. Virol.*, 75, 115-21.
 72. RAY, E. K.; LEVITAN, D. B.; HALPEN, B. L., and BLOUGH, H. A. 1974. A new approach to viral chemotherapy. Inhibitors of glycoprotein synthesis. *Lancet*, 2, 680-83.
 73. REINKE, C. M.; DRACH, J. C.; SHIPMAN, C. (Jr.), and WEISSBACH, A. 1978. En: G. DE THE, W. HENLE and F. RAPP (ed.). *Oncogenesis and Herpesviruses*, III, part 2, 999. IARC Press, Lyon.
 74. ROLLINSON, E. A., and WHITE, G. 1983. Relative activities of acyclovir and BW759 against Aujeszky's disease and equine rhinopneumonitis viruses. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24, 221-26.
 75. SCHAEFFER, H. J.; BEAUCHAMP, L.; DE MIRANDA, P.; ELION, G. B.; BAUER, D. J., and COLLINS, P. 1978. 9-(2-hydroxyethoxymethyl) guanine activity against viruses of the herpes group. *Nature*, 272, 583-85.
 76. SCHINAZI, R. F.; PETERS, J.; SOKOL, M. K., and NAHMAS, A. J. 1983. Therapeutic activities of 1-(2-fluoro-2-deoxy- β -D-arabinofuranosyl)-5-iodocytosine and -thymine alone and in combination with acyclovir and vidarabine in mice infected intracerebrally with herpes simplex virus. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 24, 95-103.
 77. SCHWARZ, P.; SHIPMAN, C. (Jr.), and DRACH, J. L. 1976. Antiviral activity of arabinofuranosyladenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in the presence of an adenosine deaminase inhibitor. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10, 64-74.
 78. SHIPMAN, C. (Jr.); SMITH, S. H.; CARLSON, R. H., and DRACH, J. L. 1976. Antiviral activity of arabinosyladenine and arabinosylhypoxanthine in herpes simplex virus-infected KB cells: selective inhibition of viral deoxyribonucleic acid synthesis in synchronized

- suspension cultures. Antimicrob. Ag. Chemother., 9, 120-27.
79. SIDWELL, R. W.; HUFFMAN, J. H.; KHARE, G. P.; ALLEN, L. B.; WITKOWSKY, J. T., and ROBINS, R. K. 1972. Broad spectrum antiviral activity of virazole: 1- β -D-ribofuranosyl 1,2,4-triazole-3-carboxamido. Science, 177, 705-6.
 80. SMITH, K. O.; GALLOWAY, K. S.; KENNELL, W. L.; OGILVIE, K. K., and RADATUS, B. K. 1982. A new nucleoside analog, 9-((2-hydroxy-1-(hydroxymethyl)ethoxy) methyl) guanine, highly active *in vitro* against herpes simplex virus types 1 and 2. Antimicrob. Ag. Chemother., 22, 55-61.
 81. SMITH, R. A., and KIRKPATRICK, W. 1980. The pharmacology of ribavirin. En: Developments in Antiviral Therapy, 133-56.
 82. STEINBERG, A. D.; KLASSEN, L. W.; WILLIAMS, G. W.; REINERTSEN, J. L., and GERBER, N. L. 1980. Ribavirin treatment of murine systemic lupus erythematosus. En: R. A. SMITH and W. KIRKPATRICK (ed.). Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent, 201-11. Academic Press, London, New York.
 83. STEPHEN, E. L., and JAHRLING, P. B. 1979. Experimental Lassa Fever virus infection successfully treated with ribavirin. Lancet, 1, 268-69.
 84. STEPHEN, E. L., JONES, D. E., PETERS, C. J., EDDY, G. A., LOIZEAUX, P. S., and JAHRLING, P. B. 1980. Ribavirin treatment of toga-, arena-, and bunyavirus infections in subhuman primates and other laboratory animal species. En: R. A. SMITH and W. KIRKPATRICK (ed.). Ribavirin: A Broad Spectrum Antiviral Agent. Academic Press. London, New York.
 85. STEWART, W. E. 1981. The Interferon System. Academic Press, London, New York.
 86. SUNDQUIST, B., and ÖBERG, B. 1979. Phosphonoformate inhibits reverse transcriptase. J. Gen. Virol., 45, 273-81.
 87. SVENNERHOLM, B.; OLOFSSON, S.; LUNDÉN, R.; VAHLNE, A., and LYCKE, E. 1982. Adsorption and penetration of enveloped herpes simplex virus particles modified by tunicamycin or 2-deoxy-D-glucose. J. Gen. Virol., 63, 343-49.
 88. TAMM, I.; FOLKERS, K., and HORSFALL, F. L. (Jr). 1952. Inhibition of influenza virus multiplication by 2,5-dimethylbenzimidazole. Yale J. Biol. Med., 24, 559.
 89. TAMM, I., and NEMES, M. M. 1959. Selective inhibition of poliovirus multiplication. J. Clin. Invest., 38, 1047.
 90. WATANABE, K. A., REICHMAN, U.; HIROTA, K.; LÓPEZ, C., and FOX, J. J. 1979. Synthesis and antiherpesvirus activity of some 2'-fluoro-2'-deoxyarabinofuranosyl pyrimidine nucleosides. J. Med. Chem., 22, 21-4.
 91. WEATHERALL, M. 1982. An end to the search for new drugs? Nature, 296, 387.
 92. WIGDAHL, B.; SCHECK, A. C.; ZIEGLER, R. J.; DECLERCQ, E., and RAPP, F. 1984. Analysis of the herpes simplex virus genome during *in vitro* latency in human diploid fibroblasts and rat sensory neurons. J. Virol., 49, 205-13.
 93. WINGARD, J. R.; HESS, A. D.; STUART, R. K.; SARAL, R., and BURNS, W. H. 1983. Effect of several antiviral agents on human lymphocyte functions and marrow progenitor cell proliferation. Antimicrob. Chemother., 23, 593-97.
 94. WITTEK, A. E.; COHEN, P. S.; ARVIN, A. M.; SMITH, S. D.; KOROPCHAC, C. M., and DECLERCQ, E. 1983. Effects of (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine on proliferation of human fibroblasts peripheral blood mononuclear cells and granulocyte-monocyte progenitor cells *in vitro*. Antimicrob. Ag. Chemother., 24, 803-6.
 95. WOHLRAB, F.; MAYO, D. R.; HSINNG, G. D., and FRANKE, B. 1983. Induction of nuclear deoxyribopyrimidine triphosphatase and sensitivity of clinical isolates of herpes simplex virus to (E)-5-(2-bromovinyl)-2'-deoxyuridine. Antiviral Res., 3, 1-5.

NORMAS PARA LOS AUTORES

«Microbiología Española» publica trabajos y notas de investigación originales dentro del campo de la Microbiología y, ocasionalmente, artículos de revisión. Textos, en español o inglés.

Sólo se admitirán trabajos inéditos que no estén pendientes de publicación en cualquier otra revista. Los originales publicados en «Microbiología Española» podrán ser reproducidos, siempre que se indique su origen.

Los trabajos, por duplicado, estarán escritos a máquina, a doble espacio, en hojas UNE A-4 por una sola cara, numeradas correlativamente y con márgenes de 2,5 cm como mínimo; no deberán exceder de 12 páginas en total, incluyendo el espacio necesario para figuras y tablas.

Las fotografías deberán limitarse a las estrictamente necesarias para la comprensión del trabajo, y serán de calidad suficiente para asegurar una buena reproducción. Deberán estar numeradas al dorso, indicando el apellido del primer autor, a lápiz. Los textos de las mismas irán mecanografiados a doble espacio y en hoja aparte.

Los dibujos y gráficas, con tinta china negra y en papel vegetal, o bien fotografías de los mismos. Para su presentación se seguirán las normas dadas para las fotografías. Dibujos, gráficas y fotografías irán numerados de forma conjunta y correlativamente.

Las tablas se presentarán en hoja aparte, numeradas independientemente de las figuras, con números romanos y el correspondiente título explicativo.

En la cabecera de la primera página se indicará, por este orden: título del trabajo, nombre y apellidos del autor o autores, centro en que se ha realizado el trabajo y dirección completa del mismo.

Los trabajos constarán de: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Agradecimientos (en su caso) y Bibliografía.

Los métodos conocidos se indicarán tan sólo mediante las citas bibliográficas

correspondientes. Las unidades de medida serán las correspondientes al Sistema Métrico Decimal. En cuanto a los símbolos, se utilizarán las Normas UNE, del Instituto Nacional de Racionalización y Normalización, para los textos en español. Los resúmenes de los trabajos, en español e inglés, de un máximo de 250 palabras cada uno, deberán contener un esquema del trabajo y las conclusiones abreviadas, y serán redactados para que sea posible su comprensión sin necesidad de leer total o parcialmente el original. No deberán incluir material o datos no citados en el texto. En las notas, los resúmenes no deberán exceder de 100 palabras.

La bibliografía se reducirá a la que está directamente relacionada con el tema tratado. Las citas, numeradas y alfabéticas, constarán de los siguientes datos:

Revistas: apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título del trabajo, título abreviado de la revista (según Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors), número del volumen, número de la primera y última páginas.

Patentes: apellidos de los inventores con las iniciales de los nombres propios, país y número de la patente, año de petición de la patente, nombre de la compañía propietaria de la patente.

Tesis: apellido del autor con la inicial del nombre propio, tipo de tesis, universidad en la que se llevó a cabo, sede de la universidad, año de terminación.

Libros: a) Monografías. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, año de publicación, título completo del libro, editorial y lugar, números del volumen y de la página. b) Volúmenes colectivos. Apellidos de los autores con las iniciales de los nombres propios, apellidos e iniciales de los directores de la obra, año de publicación, título completo de la obra, editorial y lugar, números del volumen y de la página.

Las notas, que no deberán exceder de

cuatro páginas, tienen por objeto la presentación de observaciones experimentales, descripción de técnicas o modificaciones metodológicas de interés. Su redacción se efectuará ateniéndose a las normas previamente descritas para los trabajos, pero suprimiendo las divisiones con encabezamiento, y con resúmenes no superiores a 100 palabras. Las ilustraciones y tablas se reducirán a las mínimas indispensables.

Los artículos de revisión versarán sobre temas de microbiología de amplio interés, y su redacción se solicitará a especialistas. Incluirán, en lugar de resumen, un índice del contenido.

Los autores recibirán pruebas, que deberán devolver en plazo no superior a una se-

mana. Transcurrido dicho plazo sin devolución de las pruebas, éstas serán corregidas por la Revista y publicado el trabajo. Las correcciones se limitarán a errores tipográficos, gramaticales o de datos incorrectos. Modificaciones más importantes, que impliquen recomposición del texto, deberán ser abonadas por el autor.

Cada autor tendrá derecho a 25 separatas gratuitas; si deseara más, deberá indicarlo por escrito cuando devuelva las pruebas corregidas. Las separatas adicionales serán facturadas a precio de coste.

Los trabajos se enviarán a «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, 28002 Madrid. La aceptación de los mismos corresponde al Consejo de Redacción de la Revista.

GUIDELINES TO AUTHORS

«Microbiología Española» publishes original research papers, research notes and occasionally reviews covering all aspects of microbiology. All submissions should be written in Spanish or English. The decision to accept submissions is made by the Editorial Board.

Submission of a paper to this journal is understood to imply that it has not previously been published and that it is not being considered for publication elsewhere. Consent is given for reproducing publications of this journal if accredited as the source.

Papers addressed to «Microbiología Española», Joaquín Costa, 32, 28002 Madrid, Spain, should be typewritten with double spacing and 2.5 cm wide margin on UNE A-4 format sheets. Only one side of the sheet should be used and the pages should be numbered sequentially.

Papers must be restricted to a maximum of 12 typescript pages including figures and tables. The original and one copy are required of the text, tables and illustrations.

The title should be supplied on the heading of a separate sheet, including the names of the authors, their affiliations and complete address.

Papers should be divided into: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgments (if any) and Bibliography.

Abstracts of no more than 250 words in Spanish and English should be supplied with the articles.

Well-known methods should be indicated only by references. The Metric System is to be used throughout. Symbols according to UNE rules of the National Rationalization and Standardization Institute for texts in Spanish.

Only those photographs which are strictly necessary for the understanding of the paper should be submitted. Photoprints must be of sufficient quality to ensure good reproduction. They should be numbered on

the back and identified with the first author's name written in pencil.

Drawings and line-figures should be drawn in black ink on tracing paper. Photoprints are also acceptable instead of the originals, in any case, they should be marked in the same way as photographs. Drawings, graphs and photographs should be numbered jointly and consecutively.

Legends for line-drawings and photoprints must be typed, double-spaced on a separate sheet.

Tables should be compiled on separate sheets with a descriptive title and numbered independently of the figures using roman numerals.

Bibliography should be confined to the directly related to the concerned subject, numbered and alphabetized.

References to journals should contain the names and initials of all authors, the year of publication, the title of the paper, the title of the periodical abbreviated according to Chemical Abstracts-Bibliographic Guide for Editors and Authors. These should be followed by the volume number first and last page numbers.

References to patents should contain the names and initials of all inventors, country and number of patent, year of application and name of the company owning the patent.

References to thesis should contain the name and initials of the author, type of thesis, name of the University where submitted, place and year.

References to books should also include the names and initials of all authors, editors if applicable, year, title of the book, volume, page, publishers and town.

Notes should be restricted to 4 typescript pages and are intended to present experimental observations and descriptions of techniques or methodological changes of interest. They should be written according to the guidelines given for papers, but without the heading divisions,

and their abstracts should not exceed 100 words. Figures and tables should be kept to a minimum.

Review articles should deal with microbiological subjects of broad interest. Specialists will be called upon to write them. Instead of an abstract, they will contain a list of contents.

On acceptance of the paper, one galley proof will be sent to the nominated author

to check for typesetting accuracy. The corrected proofs shall be duly return within one week's time. If delay were observed, the proofs will be corrected by the editorial staff and published. Broader changes implying recomposition of the text will be at the author's expense.

For each author 25 free reprints will be supplied. Additional reprints will be billed at cost price if requested in written upon returning the corrected galley proofs.