

ESTUDIOS DE LOS ESTREPTOCOCOS INTESTINALES EN LAS INFECCIONES URINARIAS

Primer informe de un trabajo en desarrollo *

HECTOR COLICHÓN A; SONIA BURNSTEIN DE HERRERA; JOSÉ M.
GUEVARA Y ALEJANDRO COLICHÓN Y. **

Un intento para estudiar los estreptococos u otras bacterias en determinadas infecciones urinarias o urogenitales por aplicación de la técnica de la gelificación del plasma (1) es el objetivo principal del presente trabajo. Esta nueva técnica proporciona prematuramente algunos datos de interés, como la movilidad, la tendencia microaerófila, aerobia, o anaerobia de la cepa al ser aislada. Descartando las bacterias que fermentan lactosa con gases y empleando el método de las diluciones seriadas, el Gel puede servir como una simple y fácil técnica de conteo de bacterias para las orinas de los pacientes que conducen determinados procesos crónicos, particularmente: Pielonefritis.

Sembrando por punción profunda, en el plasma gelificado se pone en evidencia la acción fibrinolítica (1, 2) de muchas cepas de Enterococo, la que puede ser de diversos grados y modalidades.

En un primer grupo de enfermos urinarios estudiados, en los que se aisló Enterococo de la orina, y un pequeño grupo de cepas aisladas de las heces de pacientes de afecciones intestinales crónicas, a la vez que se comprobó la acción fibrinolítica ya referida, se demostró la frecuencia con que en estos casos se aíslan cepas de Enterococos coagulasa positivo.

* Con la asistencia técnica de las Señoritas Corsina Velazco y Gladys Pachas.

** Con ocasión del Tercer Congreso Latino-Americano de Microbiología Bogotá-Colombia.

MATERIAL Y METODOS

Muestras de Pacientes.

Se procuró seleccionar casos que teniendo el síndrome de pielonefritis, prostatitis y afecciones intestinales de evolución crónica, el diagnóstico bacteriológico de rutina no había proporcionado resultados satisfactorios para la clínica.

Los 17 casos en este primer informe del trabajo que presentamos fueron seleccionados entre 60 casos del trabajo de rutina, por no haber tenido por las técnicas usuales resultados estimables clínicamente, y, además, porque no teniendo gérmenes como el *B. coli* o *Klebsiella* no ofrecían facilidades para cultivar y hacer un conteo de colonias en el gel.

El medio de Gelificación "ML".

Fue preparado según el método descrito en otro trabajo (4).

El plasma.

Fue obtenido de sangre citratada al 0.6 p. 100, empleándose para la preparación del gel la proporción de 10 ml. para 90 ml. de caldo "ML".

Contaje y Aislamiento de Colonias.

Tan pronto se obtuvo la orina, líquido o heces del paciente, inmediatamente se procedió a realizar las observaciones microscópicas concernientes a determinar el número aproximado de bacterias presentes en la muestra que a continuación ha de sembrarse:

Orina: 1 ml. de orina recién emitida es sembrada en 9 ml. de caldo "ML". Con una pipeta graduada de 5 o 10 ml. se practica esterilmente su adecuada mezcla sin producir burbujas o espuma. La orina queda diluida a 1:10. De esta primera dilución se toma 1 ml. que se pasa a un nuevo tubo para tener una dilución a 1: 100. Procediendo en forma similar se llega a un tercer tubo con la dilución a 1: 1000, a un cuarto de 1: 10,000 etc.

Al final tenemos 3 o 4 tubos conteniendo 9 ml. de orina diluida en medio "ML". Se agrega entonces con una nueva pipeta estéril 1 ml. de

plasma de conejo a cada tubo. Después de añadir el plasma, la mezcla se pasa asepticamente a un tubo estéril de doble o triple capacidad. Para mezclar sin hacer burbujas el plasma con la dilución de la orina en Medio "ML" pasando de nuevo a su propio tubo pasa entonces a incubarse a 37°C. para producir su gelificación.

Cuando el número de bacterias es grande según el examen microscópico se hacen diluciones previas en suero fisiológico, según convenga, antes de comenzar con las del ML-Plasma.

Heces: Para su siembra en placas se usó placas de agar Mc. Conkey, SS, Desoxycholate citrate y agar verde brillante, y como medios de concentración selectiva el selenito y Tetrathionate, todos Difco. Aparte de estos fue el caldo de leche peptonizada, Difco, al que se añade 1 a 1.5 g. p. 100 glucosa. A los 3 o 4 días, de este último medio se trasplanta a la placa combinada agar sangre azida y Mannitol Salt de donde se aíslan las colonias sospechosas de enterococo. Los otros medios son para investigar patógenos de la *Familia Enterobacteriaceae*.

Medios Usuales para el Aislamiento.

Para el aislamiento del Enterococo de los productos patológicos como orina, heces, esputos, etc. empleamos las placas de agar azida, Difco (5) agregándosele 5 p. 100 de sangre de conejo; para el estafilococo hemos usado el agar Mannitol Salt, Difco (6) combinando los dos medios en una misma placa, (7) la selectividad de ambos medios se modifica en una estrecha banda de interfase, pero la siembra por dispersión en esta clase de placa permite obtener datos comparativos adicionales que son de suma importancia en la diferenciación presuntiva.

Como placa para el desarrollo general de bacterias del grupo *Streptococcus* y *Micrococcus* se empleó el agar Brain Heart Infusion Difco (8).

En estos medios se siembra el sedimento urinario obtenido por procedimiento de centrifugación y asepsia.

Medio Selectivo.

Al igual que los lactobacilos los estreptococos pueden resistir a considerables grados de acidez y esta resistencia a la acidez llega a ser de tal magnitud que todos los miembros de la *Familia Enterobacteriaceae*;

Acromobacteriaceae o *Pseudomonaceae* que pueden encontrarse presentes en los productos donde se encuentra el Enterococo, desaparecen, menos los miembros de este grupo de Estreptococos y los lactobacilos que pueden quedar hasta en cultivo puro.

El medio que para este fin hemos empleado es el de Leche peptonizada Difco al que se agrega 1 a 2 p 100 de glucosa Q. P., se le siembra con 1 a 2 gramos de heces o el sedimento de 100 ml. de orina para 10-12 ml. de medio. Después de incubar 3 a 4 días en estufa a 37°C. se siembra por dispersión las placas ya referidas para aislar Enterococo.

Caldo plasma para la Coagulasa.

A 80 o 75 ml. de caldo nutritivo o Brain Heart Infusion broth Difco, se agrega 20 o 25 ml. de plasma de conejo obtenido de sangre citratada al 0.6 p. 100.

El caldo plasma se reparte asepticamente en pequeños tubos cantidades de 1.5 ml. Después de controlar algunos de ellos se les guarda en nevera. Para realizar la prueba se trasplanta el Enterococo a un tubo de este medio y después de incubar a 37°C. por 24, 48 hrs., a veces es necesario 3 o 4 días, para que el caldo plasma se coagule cuando el Enterococo es coagulasa positivo.

Métodos de diferenciación.

Para diferenciar el Enterococo, fue necesario cultivar el cultivo en caldo con 6.5 p. 100 de NaCl; leche con 0.1 p. 100 de azul de Metileno; caldo con pH. 9.6, cultivar a 45°C. y 10°C., además, de las pruebas serológicas pertinentes.

I. LA COAGULASA EN EL ENTEROCOCO

Con suma frecuencia aislamos Enterococo de las placas sembradas con el sedimento urinario o del Gel empleado para el conteo de colonias en las infecciones urinarias crónicas, especialmente, los pielonefritis. Cinco de estas cepas fueron empleadas para realizar los experimentos presentados en el Cuadro N° 10.

Cuadro N° 10. Coagulación del Plasma hu mano y de conejo producido por el Enterococo

Enterococo Cepa N°	Porcentaje de Plasma	COAG. DEL PLASMA CONEJO			COAG. DEL PLASMA HUMANO			
		C 11 (x)	C 14	H 10	H 12			
8 7 3 5 3-9-64	5	24 hs.	24 hs.	24 hs.	24 hs.	3 d.	24 hs.	3 d.
	10	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	15	"	"	"	"	"	"	"
	20	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
8 7 4 0 3-9-64	5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	10	"	"	"	"	"	"	"
	15	"	Post.	Post.	"	"	"	"
	20	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
SyF- Sph	5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	10	"	"	"	"	"	"	"
	15	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
	20	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
8 7 4 5 Orina	5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	10	"	"	"	"	"	"	"
	15	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
	20	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
4 1 a	5	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.
	10	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"
	15	"	"	"	"	"	"	"
	20	Post.	Post.	Post.	"	"	"	"

(x) Plasmas de conejo de 11 y 14 días. Plasmas humanos de 10 y 12 díasdespués de la sangría.
 Post.: Positivo
 Negat.: Negativo.

Cuadro N° 11. Coagulación del plasma producido por cinco cepas de estafilococos aislados de igual número de casos de Mastitis

(18 Hrs. a 37°C.)

Cepa Número	Porcentaje de Plasma	COAGULACION DEL CALDO PLASMA	
		Humano (30 ds.)	Conejo (17 ds.)
61 M.	5	Total	Total
	10	"	"
	15	"	"
	20	"	"
62 M.	5	Total	Total
	10	"	"
	15	"	"
	20	"	"
63 M.	5	Total	Total
	10	id.	id.
	15		
	20		
64 M.	5	Total	Total
	10	id.	id.
	15		
	20		
59 M.	5	Total	Total
	10	id.	id.
	15		
	20		

Cada cepa fue probada en 5, 10, 15 y 20 p. 100 de plasma en caldo nutritivo o caldo infusión cerebro corazón, Difco, empleándose cuatro tubos por mezcla.

A los tres días de incubación a 37°C. la coagulación se produjo en las cinco cepas de *Enterococo*, en las mezclas que contenían 20 p. 100 de plasma, salvo las SyF/Sph y 41 a que coagularon en caldo plasma al 15 p. 100 en las mezclas C14 y C11 respectivamente, no produciéndose la coagulación en ninguna mezcla con plasma humano. En otros experimentos se pudo comprobar que hay cepas que coagulan también el plasma humano al 25 p. 100, pero es el plasma de conejo en el que la prueba es constante.

Para comparar estos resultados con los que se obtienen en el estafilococo dorado aislado del pus en cinco casos de mastitis operadas y que las cepas estuvieron en cultivo practicamente puro, se llevaron a cabo los experimentos que presentamos en el Cuadro N° 11. En este caso solo empleamos un plasma humano de 30 días de obtenido y otro de conejo de 17 días.

Las mezclas de caldo y plasma fueron exactamente las mismas que las del Cuadro N° 10. Los resultados no se hicieron esperar tanto tiempo como en el *Enterococo*; pues, tratándose del *Estafilococo* la coagulación fue rápida, produciéndose, desde antes de 18 horas a 37°C., no solamente en plasma de conejo sino en igual forma en plasma humano; tampoco la coagulación dejó de producirse en las proporciones menores de plasma como 5 y 10 p. 100 en que las cinco cepas de *Enterococo* no produjeron coagulación.

II. LA FIBRINOLISIS EN EL ENTEROCOCO

En este grupo de *Streptococo* como en los del Grupo A. la fibrinólisis en el Gel (2) puede presentarse en forma rápida y total (Fig. 11) o en forma lenta tubular y gradual (Fig. 12 y 13.). Estas últimas formas de fibrinólisis se encontró con más frecuencia manifestándose en el Gel por un acentuado enturbiamiento que sigue el trazo de la punción hecha para sembrar la cepa en el plasma gelificado; si se trata de extraer el líquido queda un tubo producido por la digestión de la cepa en el Gel. En el Cuadro N° 12 se hace un estudio comparativo de las mismas cepas de *Enterococo* empleadas en el Cuadro N° 10 tanto en el Gel de plasma humano como en el de conejo, igualmente se repitieron paralelamente las pruebas de coagulación ya estudiadas (Cuadro N° 10).

Los resultados expuestos en el Cuadro N° 12 demuestran que mientras en la cepa 8740 es como en los estreptococos grupo A, rápida y total para el Gel humano, existen cepas como la 41a, 8745 que liquefactan en forma completa y rápida tanto al Gel de conejo como el Gel humano, habiendo otros como la SYF en que el plasma humano ofrece mayor resistencia a la liquefacción que el plasma de conejo. La cepa 8735 carece de acción fibrinolítica, es una cepa fibrinolisis negativa y coagulasa positiva.

Como ya fue referido en el Cuadro N° 10 todas estas cepas son Coagulasa Positiva.

Cuadro N° 12. Fibrinolisis y coagulación del plasma producido por 5 cepas de Enterococo (A los 5 días de Inoculación a 37°C.

Enterococo N°	Porcentaje de Plasma	LIQUEFACCION DEL GEL		COAGULACION DEL PLASMA	
		Humano	Conejo	Humano	Conejo
8740	5	TOTAL	1/6 *	NEGATIVO	NEGATIVO
	10	"	"	"	"
	15	"	"	"	"
	20	"	"	"	POSITIVO
41 A	5	TOTAL	TOTAL	NEGATIVO	NEGATIVO
	10	"	"	"	"
	15	"	"	"	"
	20	"	"	"	POSITIVO
SYF	5	3/1	TOTAL	NEGATIVO	NEGATIVO
	10	2/1	"	"	"
	15	2/2	"	"	"
	20	TOTAL	"	"	POSITIVO
8745	5	TOTAL **	TOTAL	NEGATIVO	NEGATIVO
	10	"	"	"	"
	15	"	"	"	"
	20	"	"	"	POSITIVO
8735	5	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
	10	"	"	"	"
	15	"	"	"	"
	20	"	"	"	POSITIVO

* La liquefacción del Gel de Conejo sigue el trazo de la puntura.

** Al final la liquefacción más en el fondo que en la superficie.

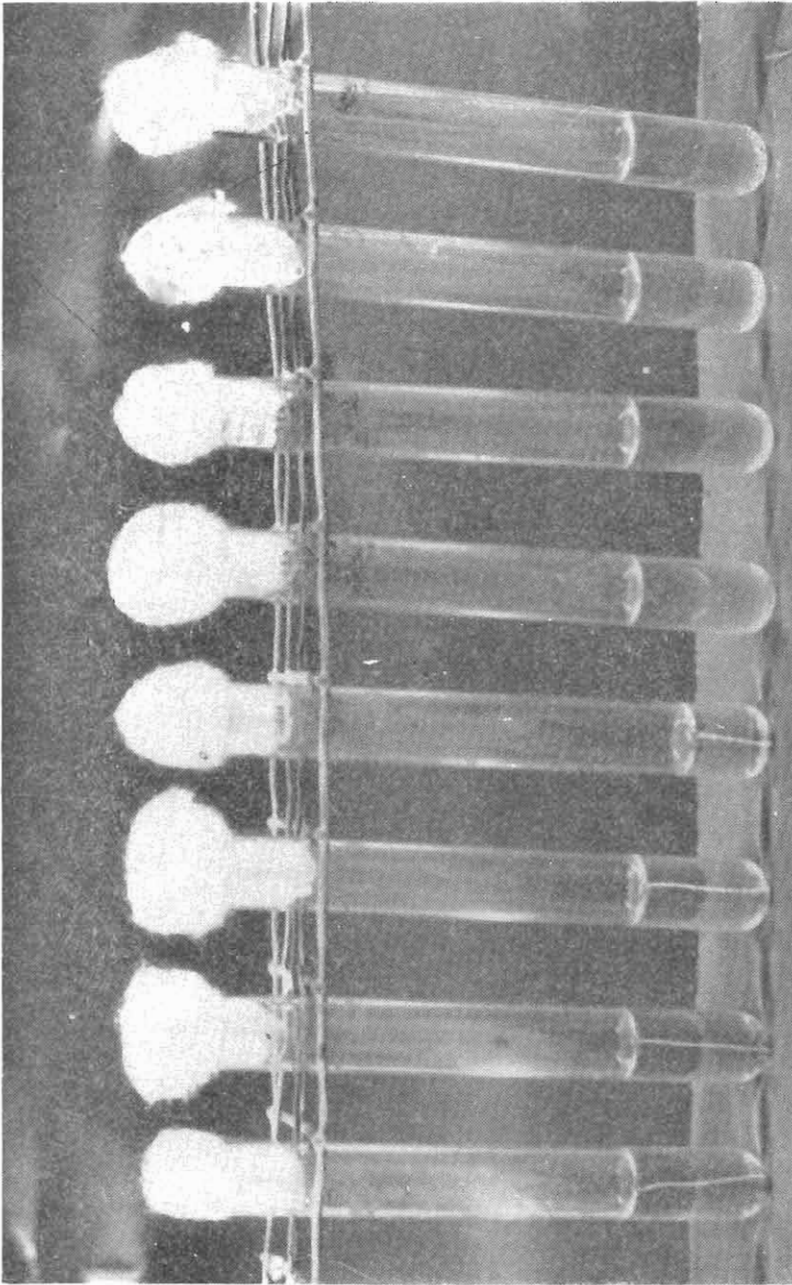


Figura Nº 11.—Liquefacción total en los cuatro tubos de la derecha.

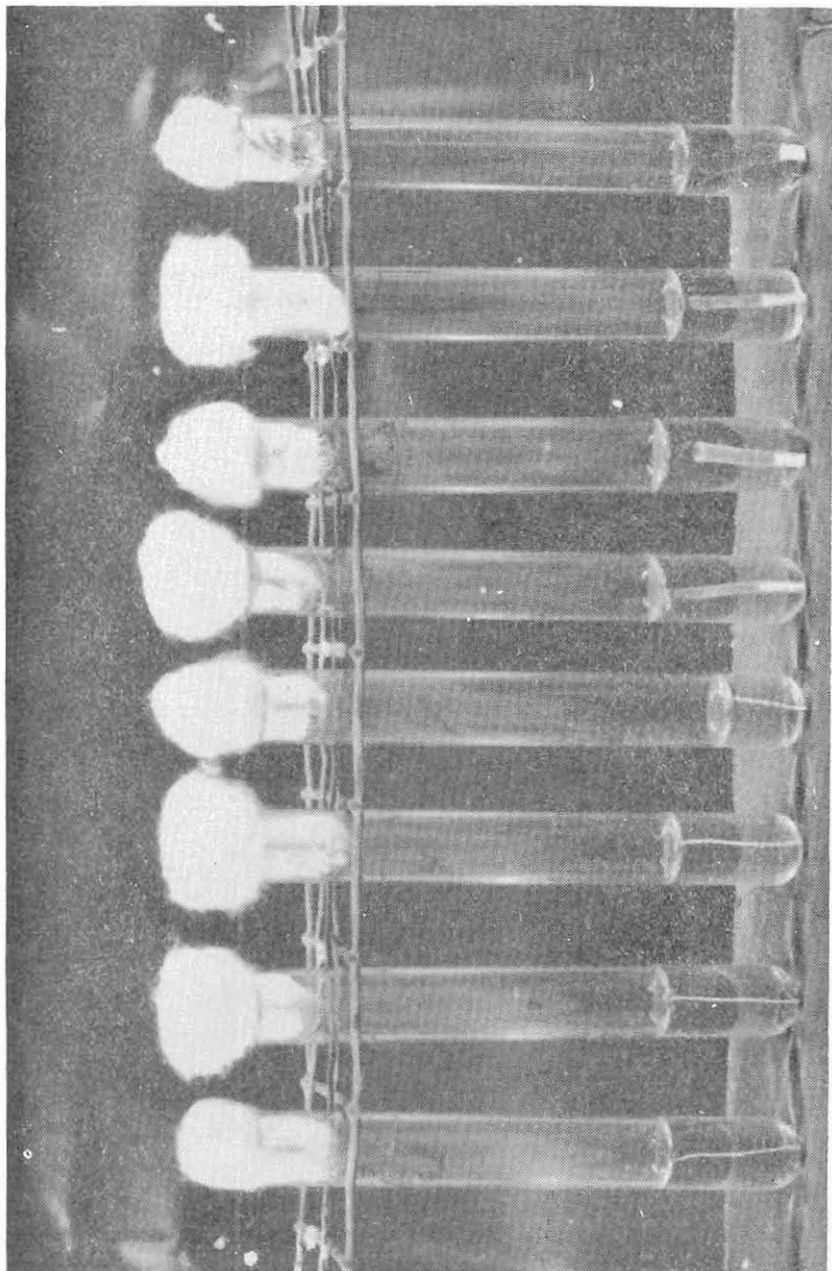
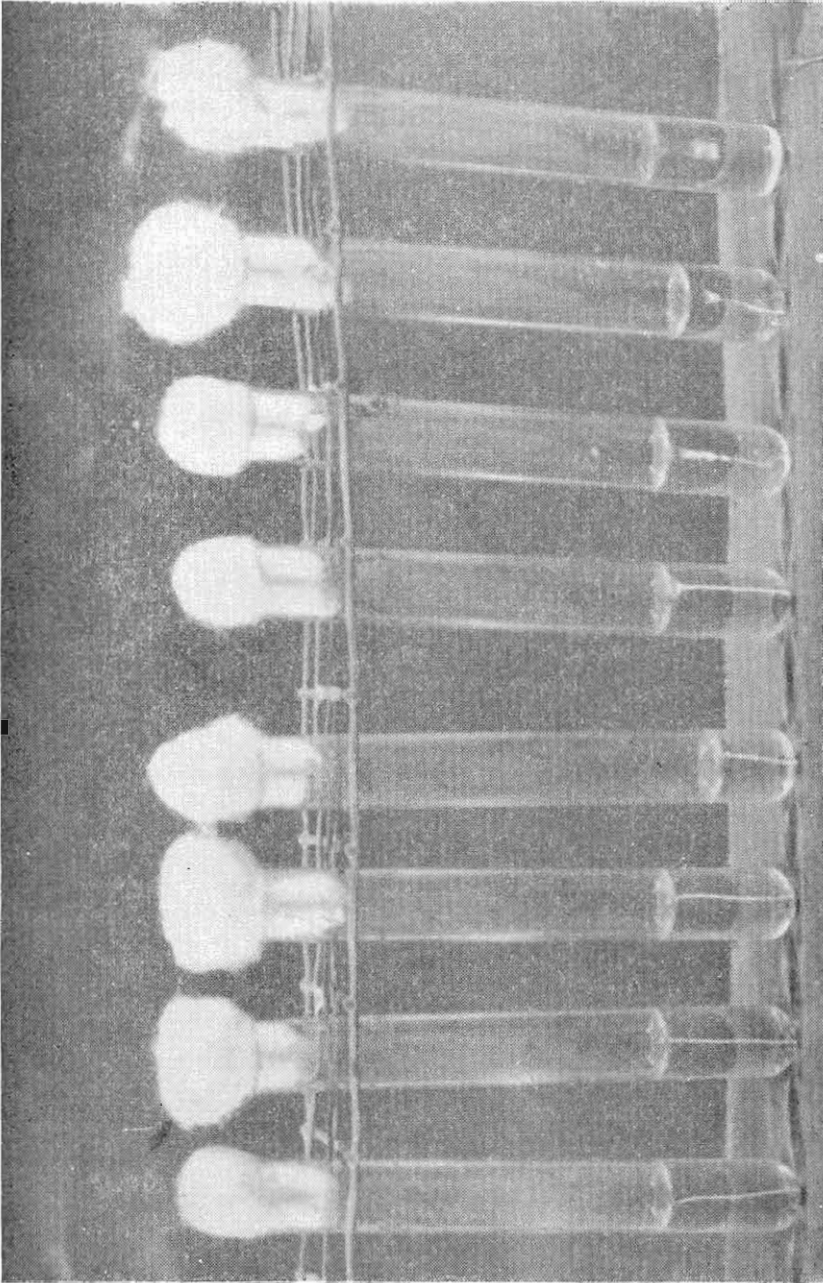


Figura N^o 12.—Liquefacción tubular en los cuatro tubos de la derecha.



Figuro Nº 13.—Vestigios de liquefacción tubular en el trayecto de la picaduso.

III. CONTAJE Y AISLAMIENTO DE COLONIAS EN EL GEL

El método ya descrito anteriormente fue aplicado para hacer una estimación del total de bacterias presentes en una muestra de orina recién emitida por el paciente. Nos basamos en la simplicidad y eco-

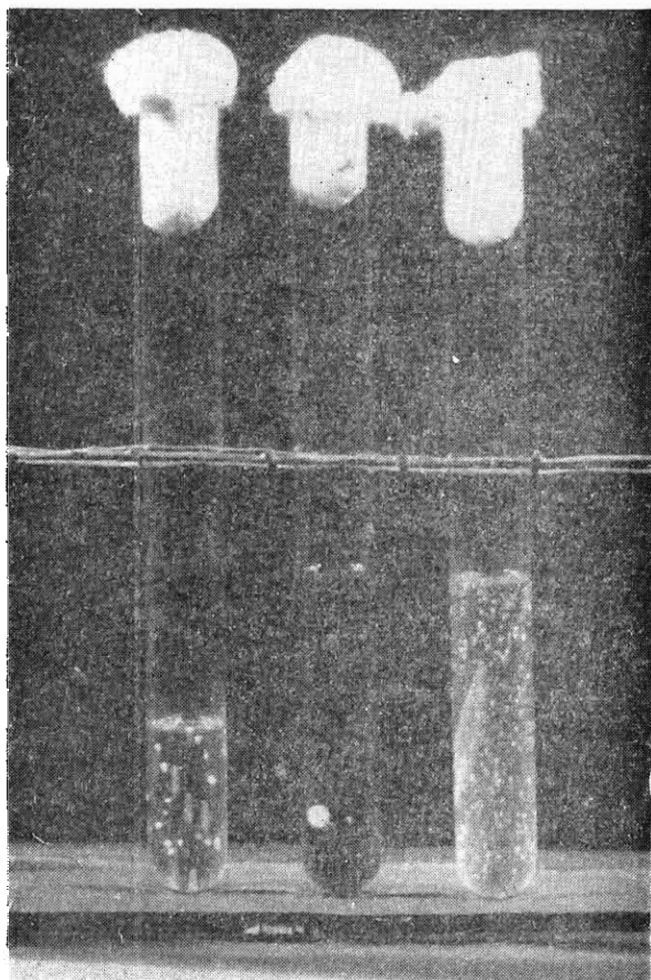


Fig. 14

nomía de trabajo, tiempo y material que ofrece el método del plasma gelificado que, evitando el agar y las placas, permite hacer un conteo en tubos utilizando las mismas diluciones efectuadas, que para este caso el diluyente es el medio ML.

Como, además, se trata de una siembra en profundidad, el método del Gel va a permitir el crecimiento de microaerófilos y anaerobios que en la técnica de la placa de agar no van a desarrollar o lo van hacer en forma tan diminuta que puede muy bien no ser tenida en cuenta pa-

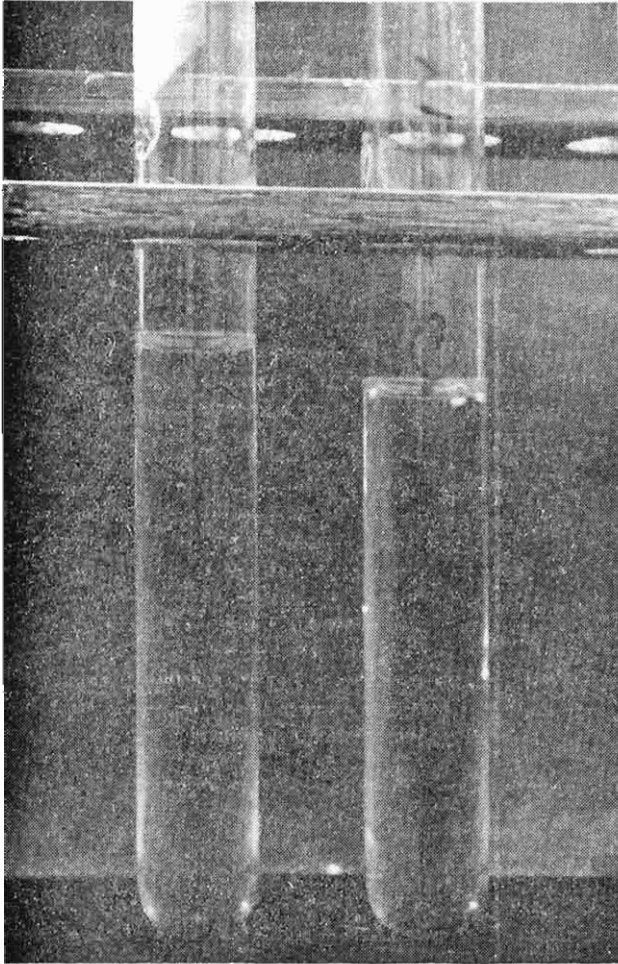


Fig. 15

ra una estimación cuantitativa, y si, además, de plasma de conejo se emplea paralelamente el plasma del mismo paciente, pueden obtenerse nuevos datos que en los métodos comunes no se obtienen. En la Fig. 14 se presentan tres tubos en gel de los propios pacientes en sus

diluciones útiles para el contaje y la observación. En el tubo de la izquierda se presentan varios tipos de colonias en que el estafilococo y el enterococo estuvieron presentes, algunas colonias de estos últimos,

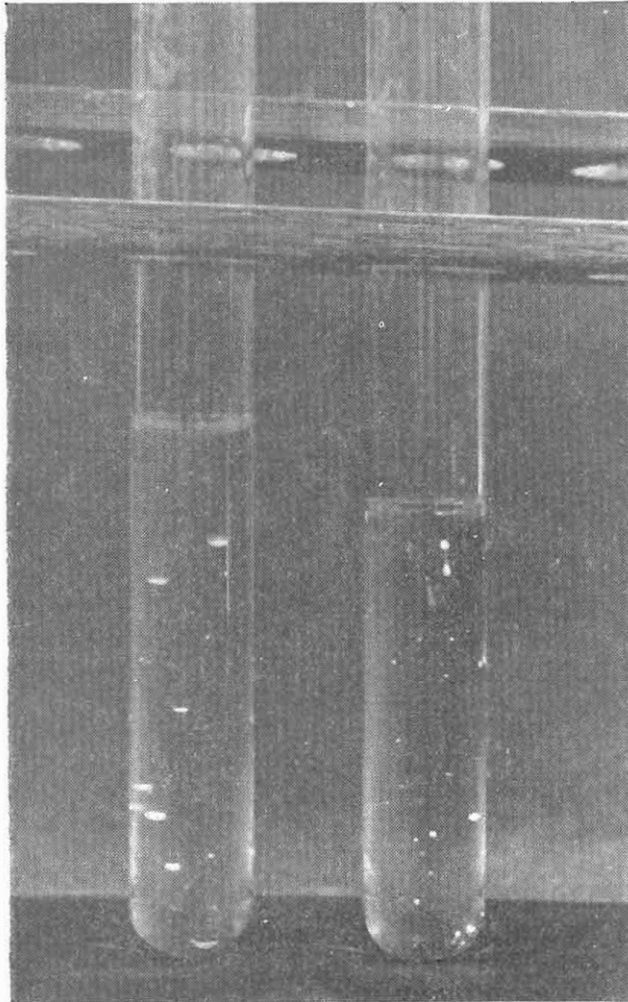


Fig. 16

presentaron una proyección turbia hacia abajo. En el tubo central la dilución alcanzó a dejar sólo dos colonias en el fondo del tubo, la más grande, Estafilococo Coagulasa Negativa, y la otra de Enterococo y, fi-

nalmente, el tubo de la derecha la última dilución (10-5) dejó todavía innumerables colonias. Consideramos que si la técnica es convenientemente perfeccionada y estudiada, puede llegar a ser de suma utilidad en la Clínica y la investigación.

En las Figs. 15 y 16 se presentan dos diluciones límites en dos casos de Pielonefritis, en uno de los cuales se rebasó el límite de *Proteus* y *E. coli* que se aislaron en las siembras en placas en dicho caso, nótese que en el Gel de plasma de conejo (c) las colonias son de mayores dimensiones que en el del plasma humano. En ambos casos las colonias pequeñas fueron de Enterococo.

IV. AISLAMIENTO DEL ENTEROCOCO DE LOS PRODUCTOS MUY CONTAMINADOS

El uso de la *leche peptonizada glucosada* al 1 o 2 p. 100, método que ya fue expuesto en la sección correspondiente, es de suma utilidad en el aislamiento de esta bacteria.

No hemos probado si todas o solamente algunas cepas de Enterococo o lactobacilos son las que resisten a tan intensa acidez, pero su experimentación en más de 120 casos de sedimento urinario y 300 coprocultivos nos inducen a realizar estudios especiales sobre este método de selección. La evidencia es que todos los bacilos Gram Negativos que pueden encontrarse presentes sea cual fuere su proporción, desaparecen a los 4 días de incubación en este medio; con muchas formas Gram Positivas también ocurre lo mismo. En realidad solo Estreptococos, lactobacilos o ambos son los que quedan después de una fuerte inoculación e incubación de cuatro días en este medio.

El uso de la placa combinada Mannitol Salt Agar y Azida blood Agar lo venimos usando con excelentes resultados en el aislamiento del Enterococo y el Estafilococo coagulasa positivos de las heces y el sedimento urinario. Como placa de subcultivo y dispersión del cultivo en leche peptonizada, junto con el Agar Brain Heart Infusion, arroja datos diferenciales de suma utilidad en este tipo de aislamientos.

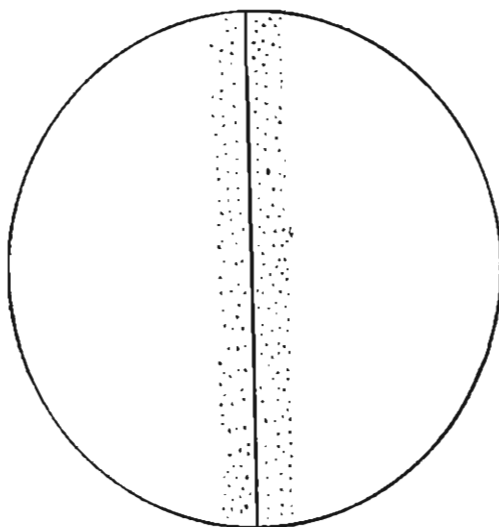
El esquema de la Fig. 17 y la sumaria descripción de la preparación de esta placa, dan la idea de esta útil disposición de dos medios selectivos (7). En las figuras 18, 19, tenemos el desarrollo de las colonias del Enterococo hemolítico y no hemolítico, así como el Estafilococo patógeno en dos casos de enfermos urinarios estudiados en este trabajo.

DISCUSION

En lo que atañe a la coagulasa en el Enterococo es necesario puntualizar tres aspectos técnicos de suma importancia.

En primer lugar está la proporción de plasma que es necesario a-

ESQUEMA DE UNA PLACA COMBINADA



N.- El Medio Agar Mannitol Salt. es repartido en placas; en la cantidad de 30 ml. de medio por placa. Procediendo asepticamente, con un cuchillo, se quita la mitad de la placa, y, luego, se rellena la parte vacía con agar azida sangre a 45°C.

FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE LOS ANGELES (CALIF.)

Fig. 17

gregar al caldo nutritivo para que el fenómeno aparezca. Tal como se demuestra en los cuadros N° 10 y 12, la coagulación no se produce en las concentraciones de 5 y 10 p. 100 de plasma; pueden haber cepas que lo hagan en caldo plasma al 15%, pero la concentración adecua-

da según estos Cuadros y nuestra propia observación en múltiples casos es la proporción de 20 a 25 p. 100 la más adecuada.

En segundo lugar está el plasma de conejo que debe ser el de elección y no el humano; no hemos estudiado el plasma de otros animales y en el Cuadro N^o 10 están los resultados que sustentan esta recomendación.

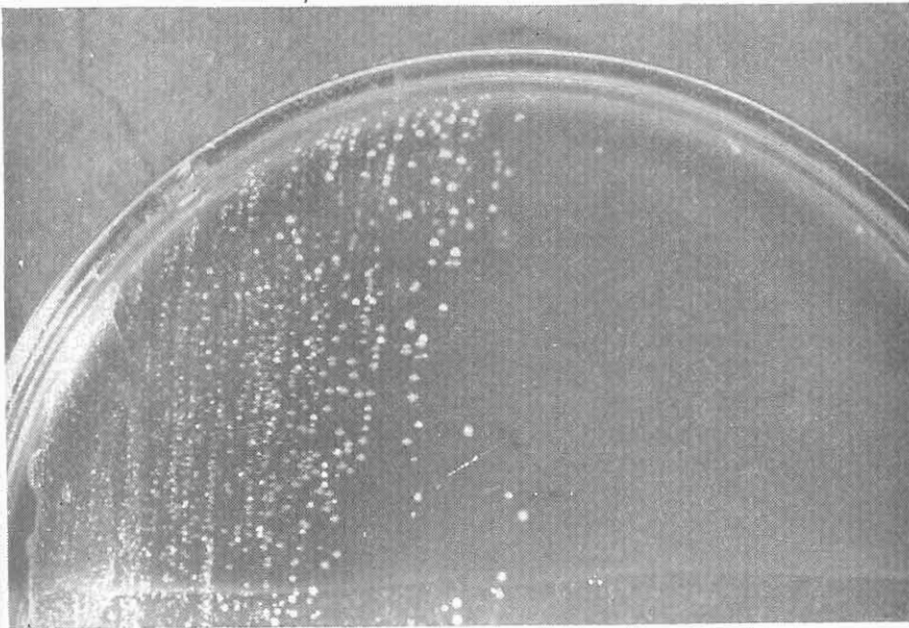


Fig. 18

En tercer lugar está el tiempo en que aparece el fenómeno de la coagulación, que según parece es variable según la cepa u otros factores, pero siempre mucho más tardía que la del Estafilococo.

En cuanto a la Fibrinolisis queda demostrado que existen cepas que liquefacian el Gel en forma rápida y total, pero también hay otras que lo hacen parcial y lentamente; no parece que el Gel humano sea más sensible que el de conejo como ocurre en los Estreptococos del Grupo A.

Como el fenómeno de la Gelificación del Plasma tarda algunas horas en producirse, empleando el método de la dilución en tubos y sin necesidad de transferir las diluciones a las placas de agar, basta la simple Gelificación para obtener colonias separadas y realizar el Con-

taje de colonias, contaje que, con la experiencia, mayor conocimiento y la reactividad del Gel de plasma del propio paciente puede arrojar datos discriminativos entre las colonias bacterianas desarrolladas en el Gel.

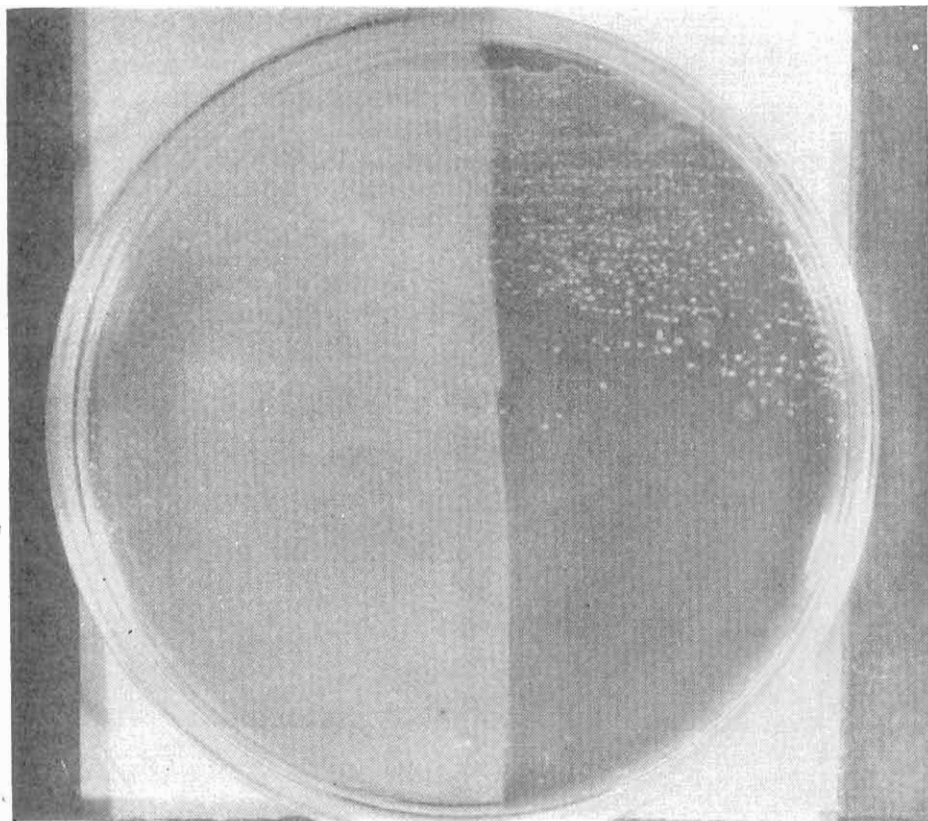


Fig. 19

La resistencia a la acidez del Enterococo o de ciertas cepas de este Grupo, permiten recomendar al medio de leche peptonizada y glucosada para su aislamiento de los productos muy contaminados, así como también la placa combinada agar azida sangre con el agar Mannitol Salt. como útil en la diferenciación de las Colonias del Enterococo.

Finalmente, la coagulasa y la fibrinólisis en el Grupo Enterococo no sólo incrementan las pruebas diferenciales de tipos o especies en este u otro grupo de Estreptococos, sino que uno de los principales objetivos del desarrollo ulterior del presente trabajo está en determinar sus

relaciones con la patogenicidad y la virulencia. Por ahora sólo presentamos los procedimientos y los primeros resultados en un reducido grupo de pacientes, Cuadro N° 13, afectados unos de dolencias intestinales y otros de afecciones urinarias; en todos ellos, que son casos crónicos, no había determinación etiológica definida, aunque según el diagnóstico clínico se indicaba la posible intervención de agentes microbianos.

Cuadro N° 13. Casos de afecciones intestinales y urinarias crónicas en los que se aisló Enterococo coagulasa y fibrinolisis positiva

AFECCIONES INTESTINALES			AFECCIONES URINARIAS		
Nº	Coagulasa	Fibrinolisis	Nº	Coagulasa	Fibrinolisis
8745	POSITIVA	POSITIVA	50	NEGATIVA	NEGATIVA
8743	NEGATIVA	POSITIVA	51 B.	POSITIVA	NEGATIVA
8742	POSITIVA	NEGATIVA	8733	POSITIVA	NEGATIVA
8730	POSITIVA	NEGATIVA	8735	POSITIVA	NEGATIVA
52	POSITIVA	NEGATIVA	41	POSITIVA	POSITIVA
44	NEGATIVA	POSITIVA	37	POSITIVA	NEGATIVA
34	POSITIVA	NEGATIVA	36	NEGATIVA	NEGATIVA
63	POSITIVA	NEGATIVA	28	NEGATIVA	NEGATIVA
			62	POSITIVA	NEGATIVA
	POSITIVA	POSITIVA		POSITIVA	POSITIVA
	6	3		6	1
	NEGATIVA	NEGATIVA		NEGATIVA	NEGATIVA
	2	5		3	8

CONCLUSIONES

1. Que existen cepas coagulasa positiva en el Grupo Enterococo (Grupo D, Lancenfield).
2. Que la técnica para determinar la coagulasa en el Enterococo requiere de caldo con 20 a 25 p. 100 de plasma, incubando hasta 3 a 4 días a 37°C.
3. Que el método del Gel hace posible determinar la fibrinolisis y sus grados en los integrantes del Grupo Enterococo.

4. Que el método del Gel puede ser también un método de conteo de bacterias, particularmente Gram Positivos.

5. Que el caldo leche peptonizada y glucosada es un método adicional para el aislamiento del *Enterococo* y *Lactobacilos* de los productos contaminados.

BIBLIOGRAFIA

1. Martin, L., 1909, *Bibl. Bact. Therap. Vaccin Serotherap.* Iera. Ed. p. 1936.
2. Tillet, W. y Garner, R. L. 1933. *Jour Exp. Med.* 58, 845.
3. Christensen. L. R., 1945, *Jour. of Gen Physiol* 28, 363-383.
4. Colichón H., Palacios E., y Colichón A. en prensa. (En estos Anales).
5. Difco Manual Ninth Edition (B 409) p. 155, 1953.
6. Difco Manual Ninth Edition (330) p. 150, 1953.
7. Colichón H., 1956, *Anal. Fac. Med.* 39, 1083.
8. Difco Manual Ninth Edition (B 418) p. 90, 1953.