

## LA TECNICA DE LA GELIFICACION DEL PLASMA \* \* \*

HECTOR COLICHÓN A; ENRIQUE PALACIOS Y ALEJANDRO COLICHÓN Y. \*

En el presente trabajo se estudia un fenómeno al que designamos: "Gelificación" y que se produce cuando el plasma citratado es añadido en proporciones adecuadas a un caldo de cultivo que se prepara en el laboratorio haciendo una digestión péptica de estómagos de cerdo (1) a la que se añade leche de vaca, con el objeto de agregar otros productos complementarios a la digestión. \* \*

El caldo nutritivo (ML) que con esta digestión se obtiene, posee la importante propiedad de producir en un tiempo no mayor de 18 horas en la estufa o a temperatura ambiente la gelificación del plasma humano, de conejo o de otros animales, siempre que la proporción de citrato o de plasma citratado se mantenga en proporciones adecuadas.

Como hay evidencia de que la fibrina es la gelificada, nos encontramos frente a una técnica práctica y sencilla para estudiar la fibrinólisis (2) o la acción proteolítica de muchas bacterias, y, sobre todo, los grados menores de actividad enzimática que algunas especies, tipos o mutantes de estreptococos u otras bacterias pueden poseer.

Si con la mezcla de caldo plasma, antes de su gelificación, se hacen diluciones de cualquier producto patológico con el objeto de contar las bacterias que contienen, al producirse el gel, las colonias quedan circunscritas e individualizadas en éste, pudiéndoseles contar y hacer

---

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

\*\* El fenómeno de la gelificación del plasma también se produce con productos derivados de la digestión péptica del grano de soya, floración azul, o el hidrolizado péptico de pescado fresco (**Engraulis ringes**).

\*\*\* Presentado en el Tercer Congreso Latinoamericano de Microbiología. Bogotá. Colombia.

determinadas evaluaciones o apreciaciones tales como la microaerofilia y hasta la anaerobiosis, si el medio antes de su gelificación se coloca en tubos apropiados para dar mucha profundidad en el fondo.

### MÉTODOS

*Medio para gelificar el plasma (ML).* Este medio se prepara a base de la antigua peptona de Martín (1) a la que se añade leche. Cuando se encuentra en pleno proceso de digestión:

Estómagos de cerdo, molidos o picados	1 kg.
Agua destilada o desmineralizada acidulada al 1. p. 100 con HCl. fumante	4 litros
Leche descremada (de vaca)	1.5 litros
HCl fumante Q. P. adicional	15 ml.

Los estómagos deben ser frescos o se conservan congelados, después de quitarles la grasa, las fibras y limpiarles el contenido, se les pica o muele por máquina de moler carne. Se pesan cantidades de 1 kg. en bolsas de plástico y se les conserva en congeladora.

*Procedimiento.* Calentar los cuatro litros de agua, agregarles 40 ml. de HCl. Q. P. fumante y cuando el calentamiento llegue a 60° C. se le agrega el kilo de estómagos molidos; la temperatura baja, pero luego se mantiene a 55° C. durante una noche y en B. M.

b) Al siguiente día, los fragmentos se han disuelto completamente. La reacción del Biuret es positiva; entonces se agrega 1,500 ml. de leche fresca descremada y a continuación se añade 15 ml. de ácido clorhídrico fumante Q. P. para acidular la leche añadida; vuelve entonces al Baño María a 55° C. quedando nuevamente en proceso de digestión una noche o más.

La preparación que debe hacerse en frasco de vidrio (Pirex) que da dos o tres días en reposo en la nevera.

Se procede entonces a separar por sifonaje con tubo de vidrio unido a otro de goma, ambos de calibre adecuado, la parte clara central. El líquido trasvasado debe ser claro, casi transparente, amarillento; la grasa sobrenadante y el sedimento de mucus, grasa y otros materiales son filtrados por lienzo, y como esto se hace con lentitud queda en la nevera uno o dos días cambiando lienzo una o dos veces.

El líquido claro sifonado o filtrado, es calentado bajo agitación y

cuando por este calentamiento el líquido se acerca a la ebullición, se le agrega cinco gramos de cloruro de sodio Q. P. por litro de medio y luego después de agitar se neutraliza con soda al 20%.

Cuando el PH. llega a 7.2 o 7.4, se suprime el calentamiento y se reparte en frascos o recipientes de vidrio resistente al calor y se esteriliza en autoclave a 15 o 20 libras por 15 o 20 minutos.

El medio en frascos esterilizados queda en reposo y para su uso hay que transferir y decantar asepticamente la parte transparente eliminado el sedimento.

*Plasma Citratado.* La sangre es obtenida en frascos o balones estériles en los que previamente se ha colocado una cantidad medida de Citrato de Sodio, Merck \* al 20 p. 100, para una cantidad determinada de sangre, la que después de mezclarse se le centrifuga para separar el plasma. La sangre debe tomarse de preferencia en ayunas. El plasma se conserva en nevera, siendo útil hasta por un mes.

*Preparación del Gel.* A cantidades determinadas de caldo ML se agrega cantidades medidas de plasma en recipiente estéril en que la mezcla se pueda hacer homogéneamente. La mezcla que no debe tener burbujas se reparte en tubos y en cantidades determinadas para los usos que se deseen. Quedan una noche a 37°C. en estufa para su gelificación y control de esterilidad.

## FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA GELIFICACION DEL PLASMA

Para que el fenómeno de la gelificación del plasma pueda producirse, es necesario considerar algunos factores que, indudablemente, intervienen. En primer lugar está la cantidad de citrato que se agrega a la sangre para evitar su coagulación y obtener el plasma; en segundo lugar, la clase de citrato que se emplea, su grado de pureza y sobretudo las moléculas de agua de cristalización que contiene; otro punto es el tiempo, un plasma citratado que a los pocos días es excelente para la gelificación, si se guarda en nevera por tiempo indefinido pierde su capacidad de gelificar; hay factores relacionados con el mamífero que provee el plasma y también, bajo toda evidencia, el proceso patológico que afecta al animal al que se sangra para obtener el plasma citratado.

---

\* Se ha usado el Pro analysis de 5½ y 2 moléculas de agua de cristalización.

Con el objeto de estudiar estos factores se han efectuado los experimentos que a continuación se relatan:

a) *Efectos del tiempo y la Cantidad de Citrato empleado para obtener el plasma.*

Cuando distintas cantidades de un determinado plasma citratado se mezclan a una cantidad similar de medio, en aquellas mezclas donde se agregó la mayor cantidad de plasma, la gelificación puede no ocurrir. En el Cuadro N° 1 se ha llevado a cabo experimentos con 2 plasmas, uno citratado al 0.5 p. 100 y otro al 1. p. 100.\*

**Cuadro N° 1. Efectos de los factores tiempo y cantidad de Citrato sobre la proporción de plasma humano requerido para su Gelificación en Caldo "ML"**

Tiempo	Porcentaje de plasma	Gelificación del Plasma citratado	
		0.5 p. 100	1 p. 100
24 hrs.	5	gelifica	gelifica
	10	gelifica	gelifica
	15	gelifica	No gelifica
	20	No gelifica	No gelifica
5 días	5	id.	id.
	10		
	15		
	20		
10 días	5	gelifica	id.
	10	gelifica	
	15	No gelifica	
	20	No gelifica	

Se hicieron tres experimentos, uno a las 24 horas, otro a los 5 días y el tercero a los 10 días de extraídos los plasmas humanos de tres personas normales diferentes. Cada experimento consta de cuatro mezclas diferentes por cantidad de plasma que cada una de ellas contiene. En la mezcla 5 se agrega a 95 ml. de medio ML, 5 ml. de plasma, en

\* Se usó Citrato Merck. pro analysis, en solución al 20 p. 100, 2.5 ml. para citarar la sangre en primer caso y 5ml. para el otro

la 10 a 90 ml. de medio se agrega 10 ml. de plasma, en la 15 a 85 ml. de medio 15 ml. de plasma; y la 20 consta de 80 ml. de medio y 20 ml. de plasma.

Después de hacer bien las mezclas se reparten en tubos, luego quedar: a 37°C. durante una noche para obtener su gelificación.

Los resultados se registran en el Cuadro N° 1 en los que se puede apreciar que siempre las mezclas de 20 p. de plasma humano no gelificaron. Que el plasma citratado al 1 p. 100 no gelifica al 15 p. 100 y que en el plasma citratado al 0.5% a los 10 días tampoco se produjo gelificación al 15 p. 100.

**Cuadro N° 2. Efecto de los factores tiempo y citrato sobre la proporción de plasma de conejo requerido para su Gelificación en el Caldo "ML"**

Tiempo	Porcentaje de plasma	Gelificación de Plasma citratado	
		0.5 p. 100	1 p. 100
24 hrs.	5	gelifica	gelifica
	10	gelifica	gelifica
	15	gelifica	gelifica
	20	gelifica	No gelifica
9 días	5	id.	id.
	10		
	15		
	20		
17 días	5	id.	id.
	10		
	15		
	20		
24 días	5	id.	gelifica
	10		gelifica
	15		gelifica
	20		gelifica

En el Cuadro N° 2 se llevan a cabo experimentos similares en estudios paralelos hasta 24 días en dos plasmas de conejo.

Para las mezclas con plasma citratado al 0.5 p. 100 la gelificación se produjo desde 5 al 20 p. 100 y desde las 24 horas hasta los 24 días de obtenido el plasma. Para las mezclas con plasma citratado al 1 p. 100 las de 20 p. 100 dejaron de gelificar, excepto el experimento con plasma de 24 días en que todas, incluso la 20, gelificaron.

En los Cuadros 3, 4 y 5 se estudian nueve plasmas humanos citratados en diversas concentraciones y en diversos tiempos transcurridos desde la obtención de la sangre.

**Cuadro N° 3. Efecto del tiempo y el citrato en la gelificación del Plasma Humano**

Tiempo	Porcentaje de plasma	Gelificación de Plasma citratado	
		0.5 p. 100	0.4 p. 100
6 hrs.	5	gelifica	gelifica
	10	gelifica	gelifica
	15	No gelifica	gelifica
	20	No gelifica	gelifica
6 días	5	<b>0.4 p. 100</b> gelifica	<b>0.8 p. 100</b> gelifica
	10	"	"
	15	"	"
	20	"	"
31 días	5	<b>0.5 p. 100</b> gelifica	<b>1 p. 100</b> gelifica
	10	id.	id.
	15	id.	id.
	20	id.	No gelifica
38 días	5		gelifica
	10	id.	No gelifica
	15		id.
	20		id.

En este cuadro, el primer plasma es probado a las 6 hrs. de obtenido; fue citratado al 0.5 y 0.4 p. 100 respectivamente. En el primer caso todas las mezclas desde 5 hasta 20 gelificaron mientras que las del plasma citratado a 0.4%, las mezclas 15 y 20 dejaron de gelificar. El segundo plasma probado a los 6 días de obtenido y citratado al 0.4 y

0.8 p. 100 respectivamente, la gelificación se produjo en todas las mezclas. El tercer plasma probado a los 31 y 38 días, todas las mezclas del plasma citratado al 0.5 p. 100 gelifican; mientras que las del citratado al 1 p. 100, el de 31 días, sólo dejó de gelificar en la mezcla 20, las de 38 días dejó de gelificar en las mezclas 10, 15 y 20.

**Cuadro N° 4 Efecto del citrato y el tiempo en la gelificación del Plasma Humano**

Número de plasma y tiempo	Porcentaje de plasma	Gelificación del Plasma citratado	
		0.5 p. 100	1.5 p. 100
N° 1 6 hrs.	5	gelifica	gelifica
	10	"	No gelifica
	15	"	"
	20	"	"
N° 2 3 días	5	0.5 p. 100 gelifica	1.0 p. 100 gelifica
	10	"	"
	15	"	"
	20	"	No gelifica
N° 3 15 días	5	gelifica	
	10	"	
	15	"	
	20	No gelifica	

En este cuadro, una parte del plasma N° 1 fue citratado al 0.5 p. 100 y la otra a 1.5 p. 100. Al realizar las mezclas con el caldo ML, todas las del plasma citratado al 0.5 p. 100 gelificaron; en cambio en las del plasma citratado al 1.5 p. 100 sólo gelificó la mezcla 5.

Los plasmas N° 2 y N° 3 citratados al 0.5 y 1.0 p. 100 y probados a los 3 y 15 días respectivamente, llama la atención el N° 3, el que citratado al 0.5 p. 100 dejó de gelificar en la mezcla 20.

En este cuadro se prueban tres plasmas citratados al 0.5 p. 100, probados a los 2, 11 y 22 días respectivamente, arrojan resultados iguales a los plasmas del Cuadro N° 4.

**Cuadro N° 5. Gelificación de plasmas humanos citratados al 0.5 p. 100**

N° de plasma y tiempo	Porcentaje de plasma	Gelificación al:
		0.5 p. 100
N° 4 2 días	5	gelifica
	10	"
	15	"
	20	"
N° 5 11 días	5	gelifica
	10	"
	15	"
	20	"
N° 6 22 días	5	gelifica
	10	"
	15	"
	20	No gelifica

Hasta aquí los plasmas humanos que se han probado, son de personas normales; un décimo plasma obtenido de un paciente de enfermedad de Hodkings, cuyo diagnóstico histopatológico fue previamente determinado, fue citratado una parte al 0.6 y otra al 1 p. 100. Las pruebas de gelificación con ellos realizados, se registran en el cuadro N° 6.

**Cuadro N° 6. La gelificación del plasma citratado en un caso de enfermedad de Hodkings**

Porcentaje de plasma	Gelificación del plasma citratado	
	0.6 p. 100 *	1 p. 100 *
5	gelifica **	No gelifica
10	"	" "
15	"	" "
20	No gelifica	" "

\* El plasma es de 7 días, después de la sangría.

\*\* Resultado a las 24 horas a 37°C.

En este plasma la gelificación se efectuó en las mezclas 5, 10 y 15 del plasma citratado al 0.6 p. 100. Todas las del plasma citratado al 1 p. 100 dejaron de gelificar.

b) *Efecto del citrato empleado.*

Estas pruebas se llevaron a cabo con citrato Merck, pro análisis, eligiéndose la concentración de 0.6 g. para 100 ml. de sangre de conejo. Dos citratos de esta marca, uno de 2 y otro de 5½ moléculas, de agua de cristalización se usaron para estas pruebas.

**Cuadro N° 6 B. La gelificación de dos plasmas de conejo citratado al 0.6 p. 100 con Citrato Merck de 2 y 5½ moléculas de agua de cristalización respectivamente**

Porcentaje de plasma 100	Plasma de conejo Citrato con 5½ H <sub>2</sub> O	Plasma de conejo Citrato con 2 H <sub>2</sub> O
5	gelifica	gelifica
10	"	"
15	"	"
20	"	No gelifica

En estas pruebas realizadas con plasmas de dos conejos diferentes, la mezcla 20 del plasma citratado con citrato de 2H<sub>2</sub>O de cristalización, dejó de gelificar. En base a esta diferencia, se realizaron entonces las pruebas de un solo plasma citratado con las dos clases de citrato.

En estas pruebas no se encuentra diferencia en cuanto a gelificación para el plasma citratado, para una u otra clase de citrato.

c) *El empleo de otros medios y suero.*

La gelificación no ha sido posible producirla con suero ni con otro medio de cultivo que no sea el medio "ML" ya señalado. Con un medio a base de digestión péptica del grano de soya o de pulpa de pescado fresco pueden llegar a producir la gelificación del plasma, pero hemos

**Cuadro N° 6 C. La gelificación de un solo plasma de conejo  
(citratado al 0.6 p. 100 con Citrato de 2 y 5½ Moléculas  
de agua de cristalización respectivamente**

Porcentaje de plasma 100	Citrato con 5½ H <sub>2</sub> O *	Citrato con 2 H <sub>2</sub> O *
5	gelifica	gelifica
10	"	"
15	"	"
20	"	"

preferido el de la peptona de Martín y la leche, por tratarse de medios bacteriológicos extensamente empleados y experimentados.

#### LA LIQUEFACCION DEL GEL POR ACCION BACTERIANA

Empleando la técnica del Gel se comprueba la acción proteolítica o fibrinolítica particular de los cultivos de *Streptococcus*, tanto en los del Grupo A como en los del D de Lancenfield; en el *Micrococcus piógenes*, *Bacillus Anthracis* como en *Pseudomonas aeruginosa*. La nueva técnica, cuya simplicidad, fácil y rápida ejecución tiene, además, la ventaja de permitir revelar la existencia de actividades enzimáticas de modalidades menores en estas u otras bacterias, actualmente la aplicamos a los Enterococos aislados de las infecciones urinarias.

La liquefacción del Gel en *Streptococcus piógenes*, (Grupo A.) concuerda con lo establecido por Tillet y Garner en 1933 (2) y por Christensen, en 1945 (3). En el cuadro N° 7 se refieren los experimentos realizados con una cepa de *Streptococcus piógenes*, (Grupo A) aislado de un caso de Mastitis puerperal. La liquefacción fue rápida y completa (total) para el gel humano. (N° 1 y 2) mientras que el Gel de conejo resiste a la liquefacción; en las mezclas 5, 10 y 15 el gel de conejo sólo se liquefactó en 1/8 a 1/10, siendo negativo en la mezcla 20. En este experimento, como los anteriores, se usaron cinco tubos de gel para cada prueba.

\* Citrato Merck pro analysis.

**Cuadro N° 7. Liquefacción del Gel producida por una cepa de *Streptococcus Hemolitico* aislado de Mastitis**

Tiempo	Porcentaje de Plasma	Liquefacción del Gel (1) (2)		
		Conejo	Humano N° 1	Humano N° 2
	5	1/8	Total	Total
44 M.	10	1/10	Total	Total
24 hrs.	15	1/10	Total	Total
37°C.	20	Negativo	6/1	Total

En la figura N° 11, los cuatro tubos de la derecha corresponden a la total liquefacción del Gel producido por esta cepa de estreptococo, los de la izquierda corresponden a otra cepa de estreptoco que no liquefacta el Gel.

Las figuras N° 12 y N° 13 corresponden a la liquefacción que en grado menor y en forma tubular que pueden presentar algunos Enterococos (Grupo D). En ambas fotos se ha colocado la otra cepa de estreptococo como control negativo.

En cuanto a los estafilococos (*Micrococcus piógenes*) la liquefacción del gel en general es parcial y tardía en aparecer. En el cuadro N° 8 se registran los resultados de la fibrinólisis en cinco cepas de estafilococos coagulasa positiva aislados de casos de Mastitis puerperal, en que se observa que la fibrinólisis puede llegar a ser total en el Gel de plasma de conejo a los cuatro días a 37°C., mientras que ante el gel de plasma normal humano no se observó la liquefacción total. El estudio se hizo en las cuatro proporciones, usándose cuatro tubos por mezcla.

- (1) El numerador indica la parte liquefactada y el denominador la parte que no ha liquefactado.
- (2) El plasma de conejo a los 42 días de la extracción, el plasma humano N° 1 a los 5 días y el humano N° 2 a los 22 días.

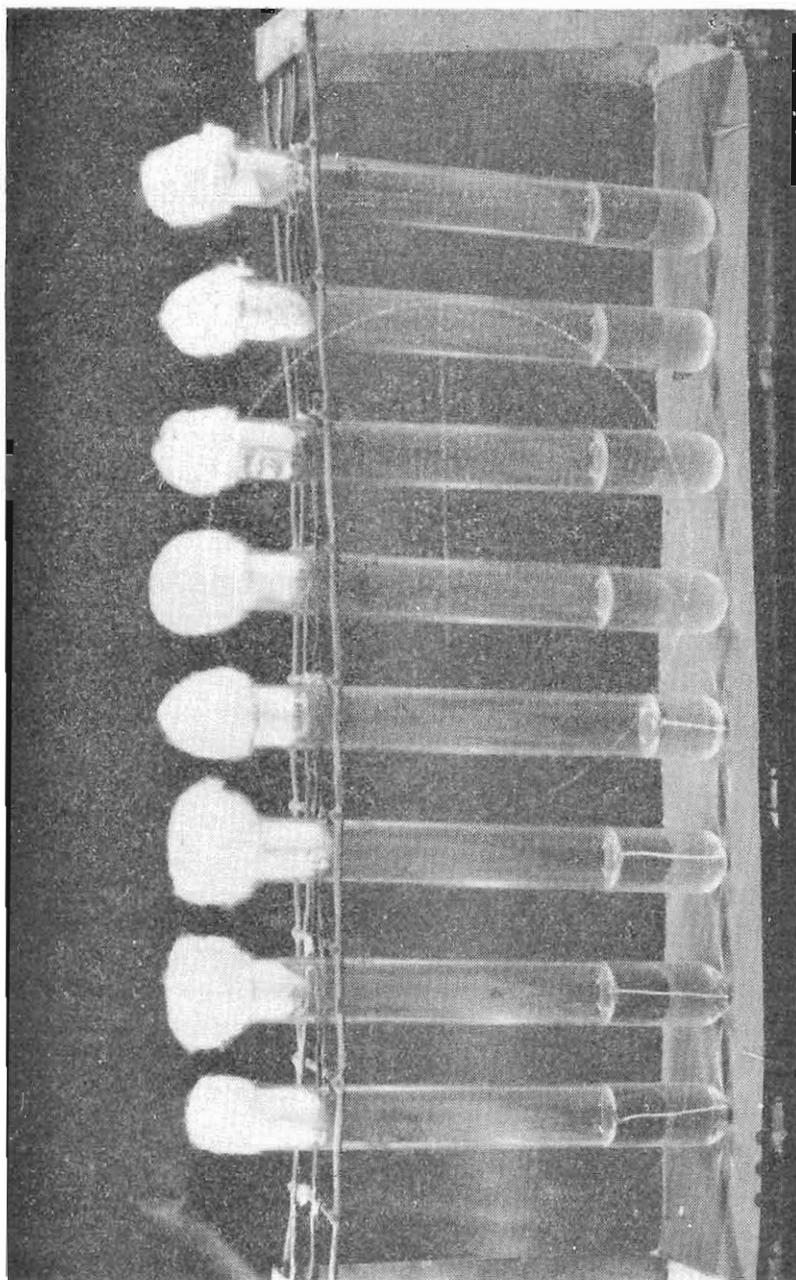


Figura Nº 11.—Liquefacción total en los cuatro tubos de la derecha.

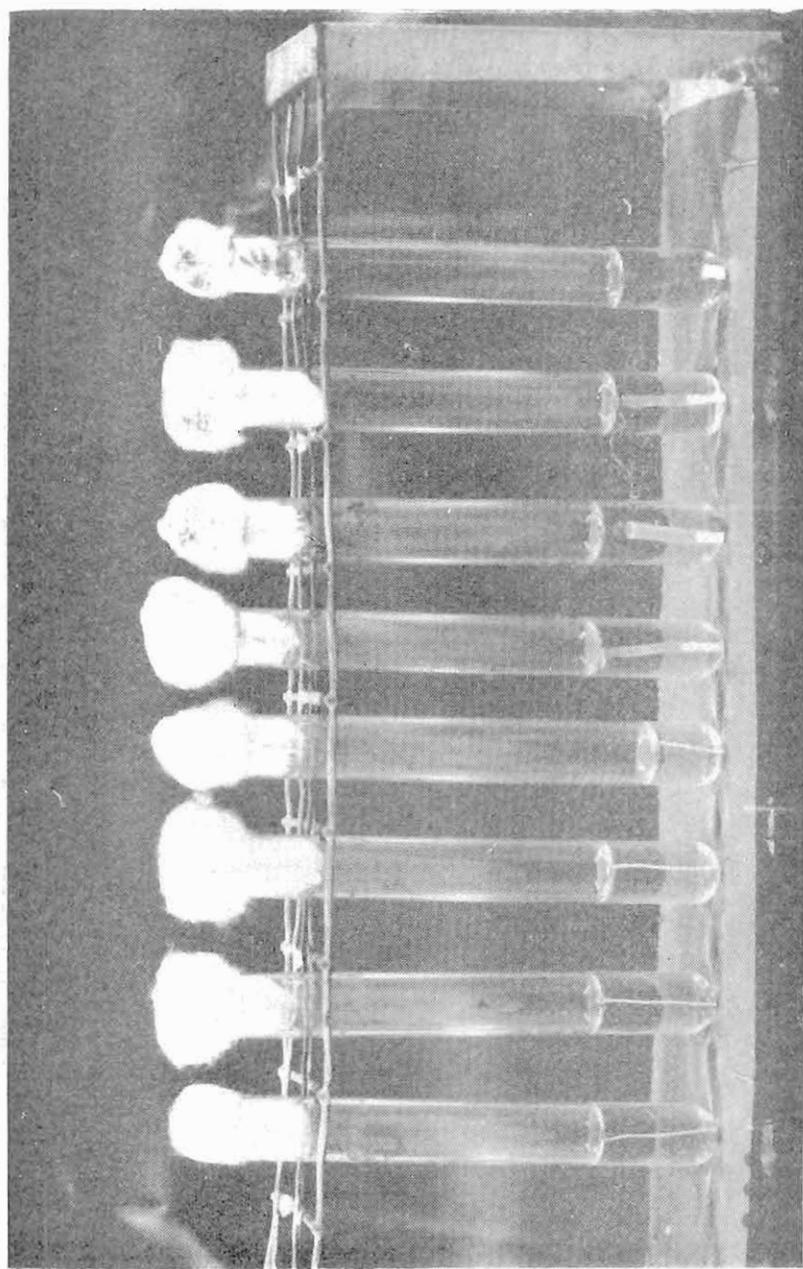


Figura Nº 12.—Liquefacción tubular en los cuatro tubos de la derecha.

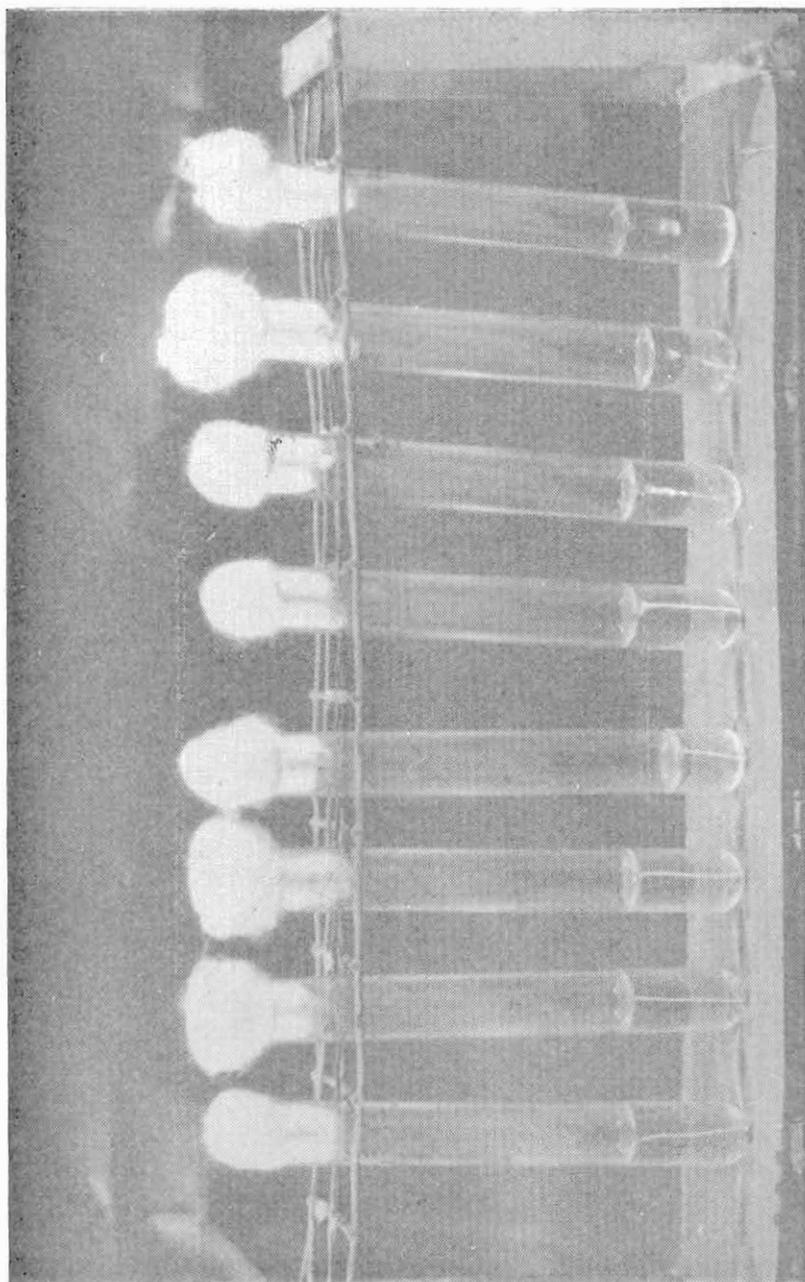


Figura Nº 13.—Vestigios de liquefacción tubelar en el trayecto de la picadusa.

**Cuadro N° 8. Liquefacción del Gel producido por cinco cepas de  
Micrococcus Piogenes de igual número de Casos de Mastitis**

Número Cepa	Porcentaje de Plasma	Liquefacción del Gel (1) (3)					
		Plasma humano (30 días)			Plasma conejo (17 días)		
		1 día	3 días	4 días	1 día	3 días	4 días
61 M. Az. Mastitis	5	1/15	1/10	1/8	1/15	1/8	1/5
	10	1/15	1/10	1/8	1/15	1/8	1/5
	15	1/15	1/10	1/1	1/15	1/8	4/1
	20				11/5	1/8	1/2
62 M. Az. Mastitis	5	1/10	1/8	1/6	1/10	1/6	1/5
	10	1/15	1/8	1/6	1/10	1/7	1/5
	15	1/15	1/8	1/1	1/10	1/8	1/5
	20				1/10	1/8	4/1
63 M. Az. Mastitis	5	1/6	1/6	1/5	1/10	1/6	1/1
	10	1/10	1/8	1/5	1/15	1/8	Total
	15	1/10	1/6	3/1	1/15	1/8	1/6
	20				1/15	1/8	1/6
64 M. Az. Mastitis	5	1/10	1/10	1/8	1/15	1/6	3/2
	10	1/10	1/8	1/7	1/15	1/6	Total
	15	1/10	1/6	3/1	1/15	1/8	1/6
	20				1/15	1/10	1/6
59 M. Az. Mastitis	5	1/15	1/8	1/8	1/15	1/6	3/2
	10	1/15	1/8	1/7	1/15	1/6	Total
	15	1/15	1/10	3/1	1/15	1/8	1/6
	20				1/15	1/10	1/6

En el Cuadro N° 8B se estudia la fibrinolisis en dos cepas de estafilococo (75 MH y 75 MH2) uno dorado coagulasa positivos, y otro albus, coagulasa negativa, hemolítico; las dos fueron aisladas de un caso pielonefritis crónica.

- (1) Las cifras del numerador indica la parte del Gel que ha liquefactado.  
(3) Plasma citratado al 0.5 p. 100 en caldo ML.

Cuadro N° 8 B. Liquefacción del Gel de Plasma Humano (H) y de Conejo (C) por Estafilococo (Micrococcus Piogenes)

Porcentaje de plasma 100	CEPA 75 MH				CEPA 75 MH2			
	C		H		C		H	
	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.	24 hs.	48 hs.
5	Negat.	Negat. (1)	Negat.	Negat.	1 Positi. tubular 1/10	Tubular (2/10)	Negat.	Negat.
10	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	Positi. tubular 1/1	Total	Negat.	1/10
15	Negat.	Negat.	Negat.	Negat.	2/1	Total	1/20	1/15
20	Negat.	Negat.	Negat.	Negat. (2)	Total	Total	1/15	1/10

75 MH: Coagulasa Negativa. Hemolítica. Albus. Desarrollo limitado.

75 MH2: Coagulasa Positiva Hemolítica. Lig. dorado. Desarrollo abundante.

(1) Trazo grueso dudoso.

(2) Vestigios de liquefacción en la superficie. 2 tubos para cada prueba.

En estos experimentos se comprueba que un estafilococo muy fibrinolítico como es la cepa 75 MH2 sólo requirió 48 hrs. para liquefactar totalmente el gel de plasma de conejo. Mientras que el plasma humano resultó negativo para la mezcla 5 y parcial entre 1/10 y 1/15 para el gel de plasma humano en las cuatro mezclas estudiadas; debiendo hacer notar que a las 24 hrs. sólo la mezcla 20 de Gel de conejo fue to-

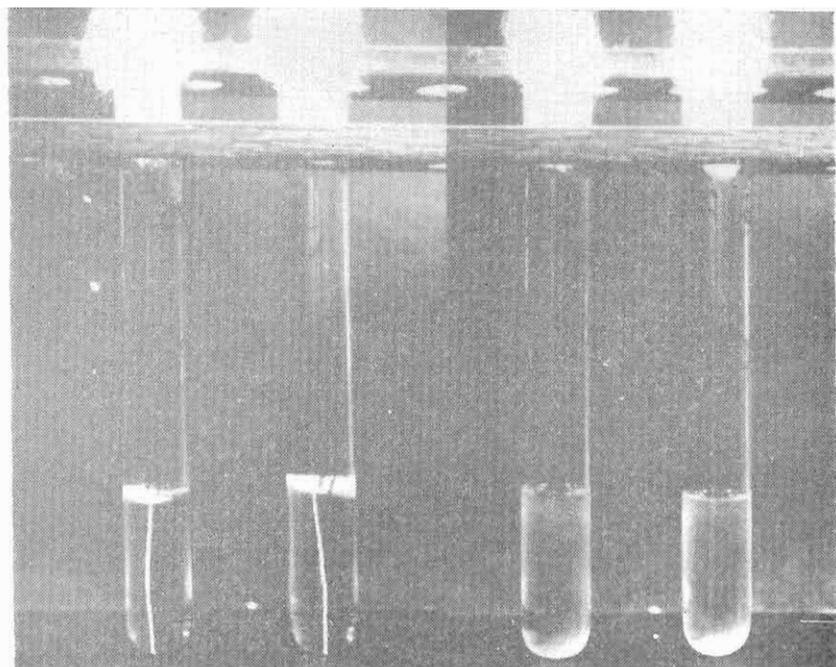


Fig. 14

tal y que la mezcla 5 de este mismo Gel fue negativa. La fig. 14 corresponde a la liquefacción de esta cepa a las 48 hrs. a 37°C. en la mezcla 10; los dos tubos de la izquierda son del Gel de conejo, las dos de la derecha son del Gel de plasma humano. El estafilococo albo coagulasa negativa, (75MH,) fue negativo en ambos.

Con respecto a la *Pseudomonas aeruginosa*, en el Cuadro N° 9 se estudia según el mismo proceso, cuatro cepas en un gel de conejo cuyo plasma fue de 11 días de obtenido y dos humanos de 10 y 5 días, respectivamente.

Cuadro N° 9. Liquefacción del Gel producido por cuatro Cepas de Pseudomona Aeruginosa

Número Cepa	Porcentaje de Plasma	CONEJO 11			HUMANO 10			OBSERVACIONES
		24 h.	48 h.	3 ds.	24 h.	48 h.	3 ds.	
66M. 10-9-64	5	1/3	4/1	4/1	1/15	4/1	Tot.	1/4 Tot.
	10	1/3	4/1	4/1	1/15	4/1	Tot.	1/4 Tot.
	15	1/3	2/1	Tot.	1/15	4/1	Tot.	1/4 Tot.
	20	1/3	2/1	Tot.	1/15	Tot.	Tot.	1/4 Tot.
								1/5 Tot.
44IL 30-5-62	5	1/1	1/1	4/1	1/1	1/4	Tot.	1/5 Tot.
	10	1/1	2/3	4/1	1/10	3/1	Tot.	1/5 Tot.
	15	0	2/3	4/1	1/8	3/1	Tot.	1/5 Tot.
	20	0	2/3	4/1	9/1	1/3	Tot.	1/10 Tot.
								1/5 Tot.
3307NL 4-5-62	5	0/1	2/1	2/2	8/1	1/1	Tot.	1/2 Tot.
	10	1/10	1/2	2/2	1/8	2/1	Tot.	1/2 Tot.
	15	1/10	1/2	3/2	1/8	1/2	Tot.	1/2 Tot.
	20	0/1	2/1	2/2	8/1	1/1	Tot.	1/2 Tot.
								1/2 Tot.
3307IL 4-3-62	5	1/6	1/1	4/1	1/6	2/1	Tot.	24 h. 1/2
	10	1/6	1/1	4/1	1/6	2/1	Tot.	1/2 4/1
	15	1/10	1/1	4/1	1/6	2/1	Tot.	1/2 4/1
	20	0/1	1/2	4/1	1/6	1/5	Tot.	1/2 4/1
								1/5 Tot.

HUMANO 5

Fluorescente sin vestigio de Pilocianina

Fluorescente con Pilocianina en la superficie de los tubos

Las colonias elegidas para estos experimentos y que se designan: "IL", presentaban lesiones líticas debidas al bacteriofago, pero los resultados en cuanto a su acción proteolítica o de liquefacción del Gel son similares a la de las no alteradas por el fago. A los 3 días la liquefacción del Gel humano fue total en la mayoría de las mezclas.

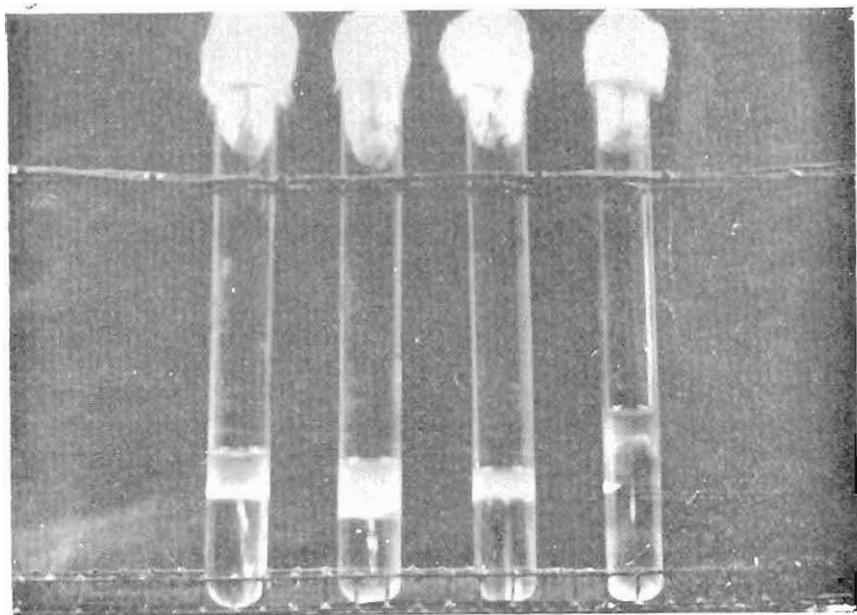


Fig. 14B

En el Gel de conejo sólo la cepa 66 M., aisladas recientemente de Mastitis liquefactó totalmente el Gel en las mezclas 15 y 20 a los 3 días de incubación a 37°C. La fig. N° 14B es una muestra de la proteolisis en *Pseudomonas* a las 36 hs.

En el caso del *Bacillus Anthracis* en el Gel como en la gelatina, se produce el fenómeno de la arborización partiendo del trazo de puntura como si se tratara del tallo. Estas arborizaciones son mayores y más numerosas en las colonias tipo "Cabeza de Medusa" de las cepas virulentas; tal es el desarrollo que presentan estas variantes en la Fig. 15. Tratándose de una cepa avirulenta para conejos y aún para cuyes como es la cepa usada en la preparación de la vacuna; esta puede presentar colonias variantes como las que aparecen en la Fig. 16, en que, al lado de una colonia tipo "Cabeza de Medusa", aparece otra junto a ella

que es lisa, de contornos continuos, que se acerca al tipo "S" usual, repicando por punción ambos tipos de colonias en el Gel. Se obtiene para la "S" en el gel un desarrollo con solo vestigios de arborescencias en la parte superior del trazo, Fig. 17; la otra colonia de tipo R

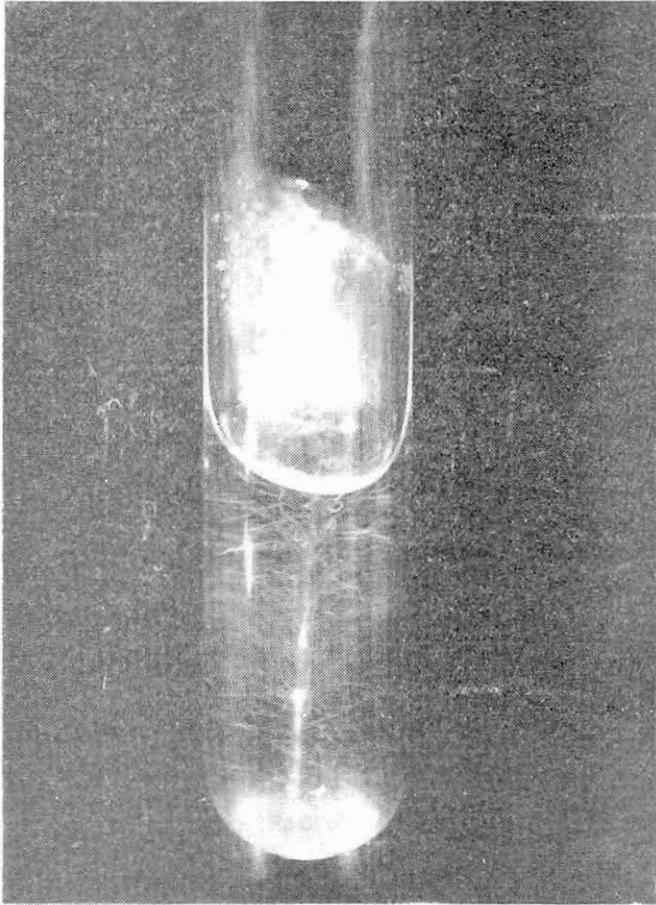


Fig. 15

con tendencia a dar "Cabeza de Medusa" producen arborescencias en todo el trazo, pudiendo ser como las presentadas en la Fig. 18 o más numerosas. En los lactobacilos también se pueden producir estas arborizaciones en el gel. En cuanto a la liquefacción, como se observará en esta última figura, se inicia en la parte superficial desde las 24

hrs. y avanza progresivamente pudiendo ser total a los 7 días a 37°C.

El gel de plasma humano parece ser algo más sensible al *B anthracis* que el de conejo; parece que la fibrinolisis no es mayor en las cepas virulentas que las avirulentas.

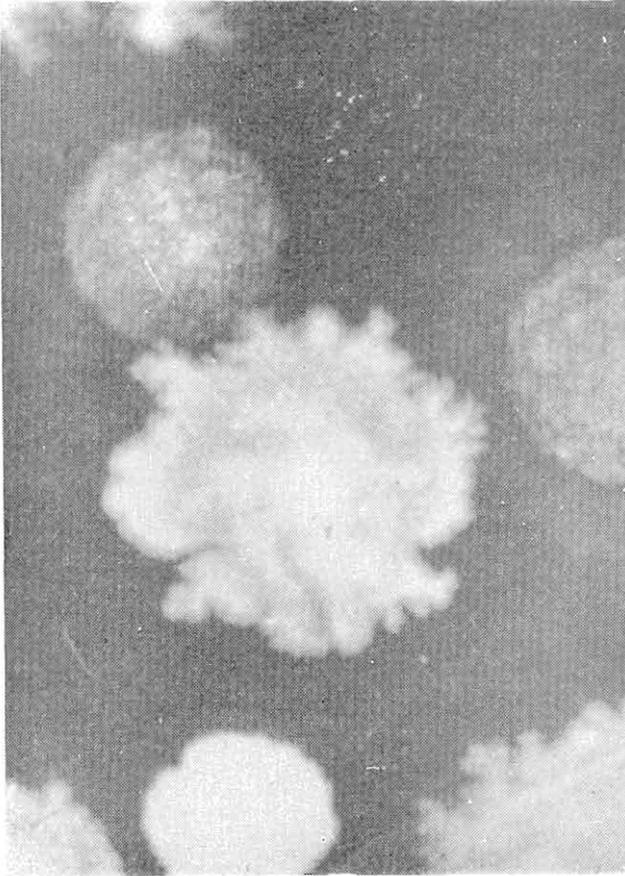


Fig. 16

#### DISCUSION

Hay evidencia que la gelificación del plasma por el Medio "ML" es producido en la fibrina; 1) porque el fenómeno ocurre con el plasma y no con el suero; 2) de que su liquefacción tiene para *Etreptococcus plógenes*, Grupo A, un comportamiento similar al encontrado por Tillet y Garner (2) y por Christensen (3); 3) porque los medios de

gelificación que hemos usado son productos ricos en sales de calcio orgánico como la leche, la digestión total del pescado y la efectuada con el grano de Soya, y 4) porque bajo ciertas condiciones y el empleo de ciertas bacterias, el Gel puede retraerse como lo hace el coágulo de fibrina.

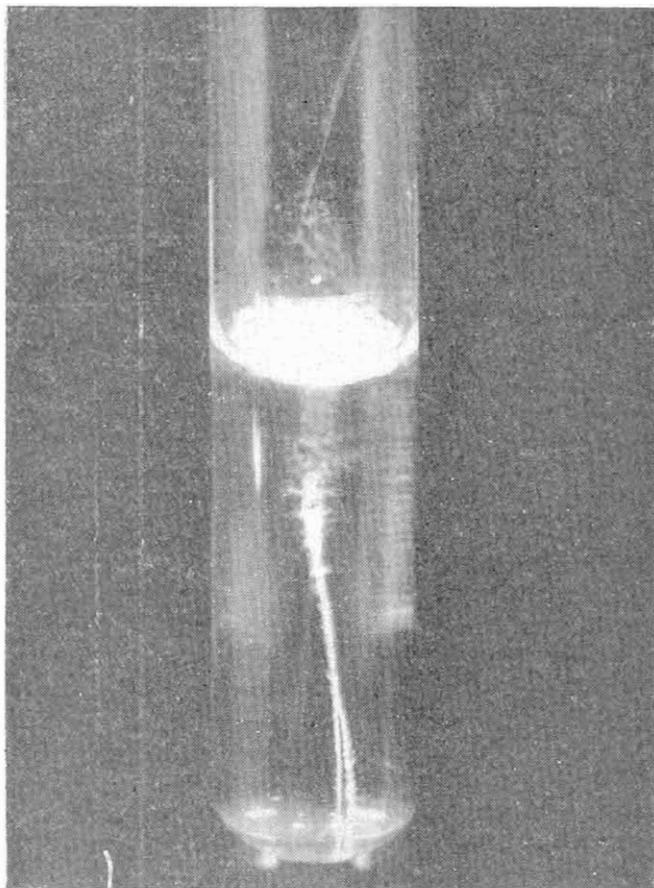


Fig. 17

Por tales consideraciones a las que se añade su extremada simplicidad de preparación, la técnica del Gel es un método práctico para estudiar la fibrinolisis en la rutina del diagnóstico; tiene ventajas sobre la gelatina nutritiva en que se le puede incubar a 37 y hasta 42°C. sin que espontáneamente se licue; aunque a esta última temperatura la gelifi-

cación del plasma se inhibe porque las temperaturas para obtener el Gel están entre 12 y 37°C.

Las ventajas del Gel sobre la técnica de Tillet y Garner están, aparte de su simplicidad, en que permite estudiar los grados menores de fibrinolisis como las encontradas en el Enterococo, Fig. 12 y 13, o las

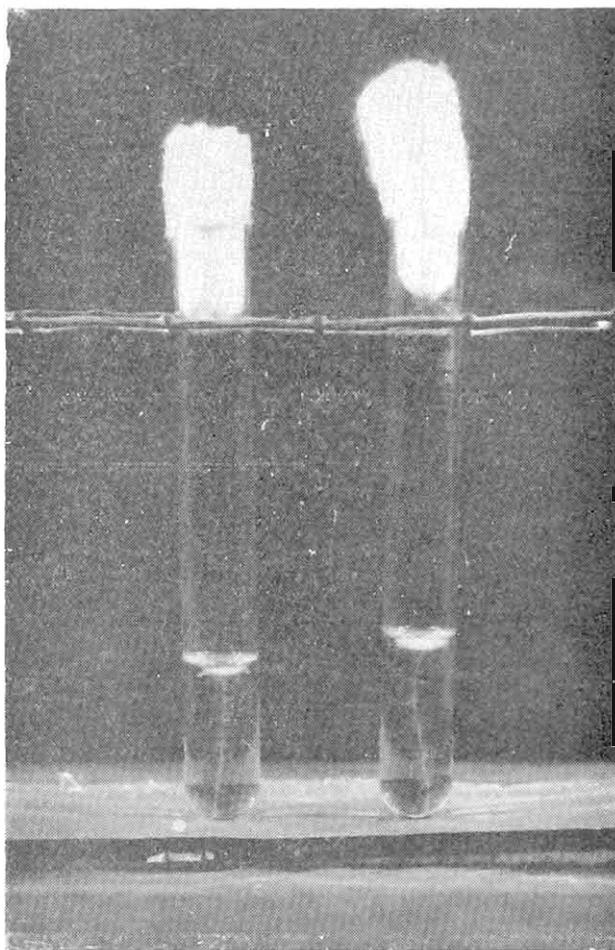


Fig. 18

que se pueden encontrar en el Estafilococo u otras bacterias, pudiendo ser usadas en el estudio de la variación microbiana en lo que atañe

**Cuadro N° 9 B. Fibrinolisis del Bacillus Anthracis para el Gel de plasma de conejo y humano (a los 7 días a 37°C.)**

Bacillus Anthracis	Proporción de Plasma	Liquefacción del Gel de conejo		Liquefacción del Gel humano	
		0.5%	1%	Plasma 1	Plasma 2
Virulento	5	4/1	2/3	3/1	Total
	10	2/2	1/5	4/1	Total
	15	2/2	2/2	2/2	3/2
	20	3/2	1/3	3/2	3/2
Avirulento	5	2/3	2/2	Total	Total
	10	2/3	2/2	Total	2/2
	15	2/2	2/2	4/1	3/1
	20	2/3	1/5	Total	Total

α enzimas proteolíticas o a otros factores como los señalados para el *B. anthracis*.

En cuanto al mecanismo de la digestión misma no nos ha sido posible dedicarle estudios especiales, consideramos que si es la fibrina la que se coagula o gelifica y que tanto la leche como la soya o el pescado son productos que contienen apreciable proporción de sales de calcio y que para someterlos a la digestión péptica, se requiere de un grado de acidez de 1 p. 100 de ácido Clorhídrico Q. P. (1) en un tiempo de 48 horas y a una temperatura de 55°C. en que las sales de calcio de dichos productos pueden solubilizarse o transformarse en sales o compuestos solubles a PH 7.2 o 7.4 que es la reacción del Medio "ML", hipotéticamente consideramos que la llamada Gelificación es un fenómeno similar al de la coagulación del plasma citratado producido por el  $Cl_2Ca$ . (2) pero que en el caso del "ML" es transparente y lenta en producirse.

### SUMARIO Y CONCLUSIONES

1. Que el plasma se gelifica por la acción del Caldo "ML", preparado a base de digestión péptica de estómagos de cerdo y leche.
2. Que los factores tiempo, cantidad de citrato o plasma citratado, tienen influencia en el fenómeno de la gelificación.
3. Que también la especie y factores individuales y patológicos pueden influir en la Gelificación del Plasma.

4. Que el *Streptococcus piógenes*, grupo A, liquefacta el Gel humano en forma rápida y completa. El Gel de conejo es resistente a la liquefacción.

5. Que el *Micrococcus piógenes* y el *Enterococo (Grupo D)* liquefactan el Gel lentamente en forma parcial o tubular; habiendo cepas o tipos que lo hacen en forma completa y rápida.

6. Que las *Pseudomonas aeruginosa* liquefactan el Gel.

7. Que el *Bacillus anthracis* liquefactan el gel y produce arborescencias como en la gelatina, estando estas en estrecha relación con la variación colonial.

8. Que existen cepas de Estafilococos de liquefacción rápida y completa del Gel de conejo que no son tan activas para el Gel humano. (Cuadro N° 8 B).

#### B I B L I O G R A F I A

1. Martín L., 1909, Bibl. Therap. Bact. Vaccin. Serotherap. 1era Ed. 1936.
2. Tillet, W. y Garner, R. L. 1933, Jour. Exp. Med. 58, 485.
3. Christensen, L. R., 1945, Jour of Gen. Physiol 28, 363-383.