

39. MOWITT, E. R.—Ann. Int. Med., 45, 242; 1956.  
 40. NEEFE, J. R., J. M. GAMBRESCIA, C. H. KURTZ, G. B. BEBBE, S. JARLON, J. C. REINHOLD y J. C. WILLIAMS.—Ann. Int. Med., 43, 1; 1955.  
 41. PRIACE, R.—Arch. Path., 61, 107; 1956.  
 42. PHILLIPS, G. B. y C. S. DAVIDSON.—Gastroenterology, 33, 236; 1957.  
 43. PONS, A. P., R. BACARDI y R. ALVAREZ ZAMORA.—Med. Clín., 5, 15; 1945.  
 44. POPPER, H.—Am. J. Path., 31, 594; 1955.  
 45. POPPER, H. y F. G. ZAK.—Am. J. Med., 24, 593; 1958.  
 46. POPPER, H. y F. SHAFFNER.—J. Am. Med. Ass., 169, 1447; 1959.  
 47. RATHER, L. J.—Am. J. Med., 21, 857; 1956.  
 48. RATTNOFF, O. D. y A. J. PATEK.—Medicine, 21, 207; 1942.  
 49. RICKETTS, W. E. y R. W. WISSLER.—Ann. Int. Med., 36, 1.241; 1956.  
 50. ROESSLE, R.—En el Hdb. d. spez. pathol. Anat. u. Histol. Henke-Lubarsch, t. V/1, pág. 243. 1930.  
 51. SHAY, H. y C. HARRIS.—Am. J. Med. Sci., 223, 286; 1952.  
 52. SMETANA, H. F.—Lab. Invest., 5, 17; 1956.  
 53. SPINK, W. W., F. W. HOFFBAUER, W. W. WALKER y R. R. GREEN.—J. Lab. y Clin. Med., 34, 40; 1949.  
 54. STILL, W. J. S.—Arch. Dis. Child., 30, 354; 1955.  
 55. STUART, K. L. y G. BRAS.—Quart. J. Med., 26, 291; 1957.  
 56. THANHAUSER, S. J. y H. MAGENDANTZ.—Ann. Int. Med., 11, 16.662; 1938.  
 57. ULZMAN, L. y D. DENNY-BROWN.—Am. J. Med. Sci., 215, 599; 1948.  
 58. WALDSTEIN, S. S., H. POPPER, P. B. SZANTO y F. STEIGMAN.—Arch. Int. Med., 87, 844; 1951.  
 59. WATTSON, C. J. y F. W. HOFFBAUER.—Am. Int. Med., 25, 195, 1946.  
 60. WEBSTER, R. y H. WILLIAMS.—Arch. Dis. Child., 28, 141; 1953.  
 61. WERTHER, J. L. y B. KORELITZ.—Am. J. Med., 22, 351; 1957.  
 62. WYATT, J. P. y J. HOWELL.—Arch. Pathol., 55, 466; 1955.

## ORIGINALS

### TOXIGENICIDAD DE LOS ESTREPTOCOCOS GRUPO A AISLADOS DE ENFERMOS CON FIEBRE REUMATICA

F. ORTIZ MASLLORÉNS y J. M. ALÉS REINLEIN.

Instituto de Investigaciones Clínicas y Médicas.  
Departamento de Bacteriología e Inmunología.  
Madrid.

Aunque es indudable la relación que existe entre los brotes de fiebre reumática y las infecciones estreptocócicas de las vías respiratorias altas, no está, ni mucho menos, aclarado el mecanismo íntimo de esta asociación. Tiene interés el hecho de que sólo una pequeña proporción (alrededor del 3 por 100) de los sujetos sin antecedentes personales o familiares de fiebre reumática desarrollan un brote agudo de esta enfermedad como consecuencia de una infección faríngea por estreptococos del grupo A. En principio, podría pensarse que el estreptococo infectante tuviese en estos casos unas especiales propiedades, que podríamos llamar reumatogénicas, o que se tratase de sujetos con una manera peculiar de reaccionar frente a estreptococos en nada diferentes de los que en otros sujetos producen una infección estreptocócica no complicada. Actualmente, la mayor parte de los datos disponibles hablan en favor de esta segunda posibilidad.

Pocos trabajos hay en la literatura referentes a las posibles diferencias entre los estreptococos del grupo A aislados de enfermos con un brote agudo de fiebre reumática y los obtenidos de infecciones estreptocócicas sin esta secuela. Parece, sin embargo, importante tratar de hallar tales diferencias, ya que un hallazgo positivo contribuiría en gran medida al entendimiento de la patogénesis de la fiebre reumática y uno negativo sería un dato más en apoyo de la segunda hipótesis.

El presente trabajo se refiere a la producción de algunos fermentos extracelulares (estreptolisina O, estreptoquinasa, proteinasa) por estreptococos hemolíticos del grupo A aislados de sujetos con fiebre reumática y otros procesos.

### MATERIAL Y MÉTODOS.

**Estreptococos.**—Se probaron 60 razas de estreptococos de las cuales 25 eran de enfermos con un brote agudo (primer ataque o recidiva) de fiebre reumática, 10 de enfermos con una infección estreptocócica aguda sin secuela reumática, y 25 de portadores asintomáticos o de sujetos con diversos procesos en los que el hallazgo de estreptococos fue puramente casual. Todos los estreptococos fueron aislados de la faringe, a excepción de tres del segundo grupo, que fueron aislados de la piel, oído medio y pus de absceso, respectivamente, y otros dos del tercer grupo, que lo fueron del esputo.

La identificación de los estreptococos se hizo por sus caracteres morfológicos y cultivo en agar sangre, haciéndose la determinación del grupo por precipitación de un extracto estreptocócico con un antisuero grupo-específico (Burroughs & Wellcome, Ltd.), según una micromodificación de la técnica de LANCEFIELD (1938), y confirmándose mediante la prueba de sensibilidad a la bacitracina, de MAXTED (1953).

Desde su aislamiento hasta su empleo para las pruebas respectivas, los estreptococos fueron conservados a -20°C, en forma de suspensión densa, en caldo de Todd-Hewitt (véase más abajo), preparada a partir de un cultivo de 18 horas en el mismo medio.

Como consecuencia de los resultados de una larga serie de experimentos preliminares, se eligieron las siguientes técnicas para la producción y determinación de cada uno de los fermentos:

**Estreptolisina O.**—Se determina midiendo la actividad hemolítica sobre hematies humanos de diluciones seriadas del sobrenadante, reducido con tioglicolato sódico, de un cultivo de 15 horas en caldo de Todd-Hewitt. Que la hemólisis es debida a la estreptolisina O se demuestra por la falta de actividad hemolítica de los sobrenadantes sin reducir y por su destrucción por calentamiento a 100°C durante 5 minutos (SLADE y KNOX, 1950).

El caldo de Todd-Hewitt se prepara a partir de la masa muscular de los ventrículos de corazón de vaca, privados lo más completamente posible de grasa, vasos coronarios principales, epicardio, endocardio y cuerdas

tendineas, siguiendo en lo demás casi exactamente la técnica original de los autores citados (TODD y HEWITT, 1932). Aunque producen un buen crecimiento de los estreptococos, no sirven para este fin los caldos desecados del comercio.

El estreptococo a probar se siembra en unos 50 ml. de caldo de Todd-Hewitt, previamente calentado a 37°C durante 30-60 minutos. Después de la inoculación del caldo, se agita el matraz y se incuba en estufa a 37°C durante 15 horas. Terminada la incubación y comprobada la pureza del cultivo por observación al microscopio de una gota del mismo sin teñir entre porta y cubre, se centrifuga hasta obtener un sobrenadante transparente, que se guarda a -20°C hasta el momento de su uso.

Para la determinación de estreptolisina O se reduce el sobrenadante en el momento de usarlo, mezclando 4 volúmenes del mismo con 1 volumen de solución al 2,5 por 100 (aproximadamente 0,2 M) de tioglicolato sódico. No todas las marcas de tioglicolato existentes en el comercio tienen suficiente actividad reductora. Para que sea útil, la solución madre al 25 por 100 (que puede conservarse 1-2 meses a 5°C o durante 6-12 meses a -20°C) debe tener un ligero, pero manifiesto, color violeta y dar olor sulfídrico característico.

De la lisina reducida se preparan diluciones seriadas de razón 2 en solución salina fisiológica, en volúmenes de 1 ml., en tubos de 14 por 100 mm. Se añade a cada tubo 0,5 ml. de solución salina fisiológica, se agita y se añade 0,5 ml. de una suspensión de hematies humanos al 5 por 100 en solución salina fisiológica (los hematies deben ser obtenidos el mismo día y lavados repetidamente en solución salina fisiológica hasta que dejen un sobrenadante claro). Se agita y se incuba 15 minutos en baño a 37°C, se agita de nuevo y se sigue la incubación otros 30 minutos. Se sacan los tubos del baño y se dejan otros 60 minutos a temperatura ambiente para que se sedimenten los hematies. Finalmente, se hace la lectura del grado de hemólisis por la presencia de hemoglobina libre en el sobrenadante. Como medida de la actividad hemolítica se toma la máxima dilución de suero capaz de producir, al menos, indicios de hemólisis.

En algunos casos se hizo, además, determinación del poder de la estreptolisina O para combinarse con su anticuerpo, que, según HODGE y SWIFT, (1933) no guarda necesariamente relación con la actividad hemolítica. Para ello, cantidades decrecientes de lisina, completadas a un volumen constante (0,5 ml.) con solución salina fisiológica, se incuban a 37°C, durante 15 minutos, con 1 ml. de suero, cuyo título de antiestreptolisina O ha sido muy cuidadosamente determinado de antemano, diluido de tal forma que 1 ml. contiene exactamente una unidad de antiestreptolisina O. Se añade a cada tubo la misma cantidad de hematies indicada anteriormente y se hace la incubación y lectura como en la prueba anterior. Una unidad de estreptolisina O está exactamente presente en el volumen de lisina contenido en el primer tubo que no muestre ni indicios de hemólisis. Estas determinaciones se abandonaron al comprobar que empleando el método descrito había una correlación absoluta entre el poder hemolítico y combinante de cada preparación, por lo que estos resultados no se reproducen a continuación.

**Estreptoquinasa.**—Para su determinación se mide la capacidad de diluciones seriadas del sobrenadante del cultivo para activar una preparación de plasminógeno humano, apreciándose esta activación por la disolución de un coágulo de fibrina. Que lo que se mide de esta manera es realmente estreptoquinasa se comprueba por su incapacidad de actuar directamente sobre la fibrina en ausencia de plasminógeno (MILSTONE, 1941).

Para las determinaciones de estreptoquinasa se emplearon las mismas preparaciones estreptocócicas que para la estreptolisina O: sobrenadante de cultivo de 15 horas en caldo de Todd-Hewitt, preparado recientemente en la forma indicada, con la diferencia de que no se hace la reducción.

Como diluyente en todas las etapas de esta prueba se emplea una solución buffer, preparada disolviendo

9,073 g. de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  en 1.000 ml. de agua destilada, y 23,880 de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2\text{H}_2\text{O}$ , en otros 1.000 ml. de agua. Se mezcla 19,2 ml. de la primera solución con 80,8 ml. de la segunda, se ajusta el pH a 7,4 con la solución correspondiente y se diluye 1/10 en solución salina fisiológica.

Para la preparación del plasminógeno humano se parte de una mezcla de sueros humanos. Un volumen de esta mezcla se diluye con 19 volúmenes de agua destilada y se ajusta el pH exactamente a 5,4 con una solución de ácido acético al 0,5 por 100. La globulina precipitada se recoge por centrifugación y se disuelve en 3 volúmenes de solución buffer. Estas preparaciones de globulina conservan su actividad plasminógeno durante varios días, por lo menos, cuando se conservan a -20°C.

El fibrinógeno empleado es fibrinógeno bovino desecado (fracción I del plasma bovino, Armour). Se prepara una solución al 0,33 por 100 en buffer, que se puede conservar varios días a -20°C.

Como trombina se emplea el preparado comercial de los Laboratorios Leo. El contenido de una ampolla (600 unidades) se disuelve en 6 ml. de solución buffer, resultando una solución con 100 unidades por ml., que se conserva bien a -20°C, y se diluye 1/10 en solución buffer en el momento de su uso.

La prueba se dispone de la siguiente manera: Se preparan diluciones seriadas del sobrenadante de cultivo en solución buffer, en volúmenes de 0,5 ml., en tubos de 9 por 100 mm. Se añade a cada tubo 0,2 ml. de la preparación de plasminógeno, se agita y se incuba 15 minutos en baño a 37°C. Se añade 0,5 ml. de solución de fibrinógeno, se agita y se añade 0,1 ml. (1 unidad) de trombina. Se agita y se sigue la incubación durante 6 horas, comprobando, pasados los primeros 5 ó 10 minutos, que en todos los tubos se ha producido coagulación. La lectura se hace agitando suavemente los tubos para ver la firmeza del coágulo o si su digestión es completa. Como medida de la actividad estreptoquinasa, se toma la máxima dilución que produce ataque, aunque sea parcial, del coágulo de fibrina.

**Proteinasa.**—Se determina midiendo la capacidad para atacar la gelatina de diluciones seriadas del sobrenadante, concentrado y purificado por precipitación con sulfato amónico y reducido con tioglicolato sódico, del cultivo de 48 horas del estreptococo en caldo de Todd-Hewitt. Que la acción proteolítica así demostrada corresponde a la proteinasa estreptocócica descrita por ELLIOT (1945), se demuestra porque las preparaciones no tienen ninguna actividad en el estado oxidado.

Para estas determinaciones se emplea caldo de Todd-Hewitt desecado (Bacto Todd-Hewitt Broth, Difcon), rehidratado, siguiendo las instrucciones de la casa productora, por haber comprobado que los resultados obtenidos con él son iguales a los ofrecidos por el caldo fresco, de preparación mucho más laboriosa.

El estreptococo a probar se siembra en unos 50 ml. de caldo, incubándose en estufa a 37°C por espacio de 48 horas, agitando de vez en cuando. Terminada la incubación y comprobada la pureza del cultivo en la forma ya señalada, se centrifuga hasta obtener un sobrenadante transparente, cuyo volumen se mide, añadiéndole suficiente cantidad de sulfato amónico en sustancia para dar 0,8 saturación (considerando como saturación completa la concentración de 72 g. de sulfato amónico por 100 ml. de sobrenadante). Se disuelve completamente la sal y se deja a 5°C durante cuatro días. Pasado este tiempo se centrifuga y se quita lo más completamente posible la fase líquida. El precipitado, en parte sedimentado, en parte formando una costra en la superficie y en parte adherido a las paredes del tubo, se disuelve en 2 ml. de agua destilada y se dializa a través de celofán Visking frente a agua del grifo corriendo, durante dos días, a temperatura ambiente. Terminada la dialisis se recoge el contenido del saco, se mide su volumen y se centrifuga para eliminar el residuo insoluble. El sobrenadante se guarda a -20°C. El volumen inicial del sobrenadante del cultivo, dividido por el resultante después de la dialisis, expresa la concentración experimentada por la proteinasa durante este proceso.

Como diluyente, en todas las fases de la determinación de proteinasa se emplea una solución buffer de ácido bórico/sosa 0,1 M, a pH 8,0.

Se preparan diluciones seriadas de razón 2 de la proteinasa en solución buffer, en volúmenes de 0,6 ml., en tubos de 14 por 100 mm. A cada tubo se añade 0,1 ml. de solución de tioglicolato sódico al 50 por 100. Se agita y se añade 0,3 ml. de solución de gelatina (Difco) al 5 por 100 en buffer. Se agita de nuevo y se incuba 24 horas en estufa a 37°C. Se agita y se pasan los tubos a la nevera (5°C) durante 2 horas, al cabo de las cuales se hace la lectura en la misma nevera o inmediatamente de sacados los tubos de la misma, inclinando la gradiella un ángulo de unos 45°. Se observa entonces que en aquellos tubos en que la digestión de la gelatina es completa, el contenido del tubo, líquido y perfectamente desplazable, adopta un nivel horizontal, mientras que la gelatina no atacada se conserva sólida y adherida al tubo. Puede haber uno o varios tubos intermedios en que la gelatina esté reblanqueada, pero no completamente líquida. Como a menudo pueden plantear dificultades de interpretación, estos tubos con proteolisis parcial se desprecian, viiniendo la actividad proteinasa determinada por la máxima dilución capaz de producir la liquidez completa de la gelatina. Esta dilución, dividida por el factor de concentración correspondiente, da una cifra que expresa la actividad proteinasa de la preparación.

En todas las determinaciones de fermentos se incluyeron controles adecuados, sustituyendo la preparación estreptocócica por un volumen igual de solución salina fisiológica o de la solución buffer adecuada. Aunque en las experiencias preliminares se había ya establecido la exacta reproducibilidad de los resultados obtenidos por estos métodos, en la serie de determinaciones de cada día se incluyó una o varias preparaciones estreptocócicas cuya actividad había sido ya determinada.

En las primeras determinaciones se tomó una muestra de cada cultivo para medir por turbidimetría el crecimiento del mismo, con el fin de ver si había alguna relación entre el crecimiento del estreptococo y la actividad fermentativa en el sobrenadante. Esta práctica se abandonó más tarde, al comprobar que las cifras de crecimiento de todos los estreptococos oscilaban entre límites estrechos, a pesar de su variable actividad enzimática.

## RESULTADOS.

Los resultados de la determinación de la producción de los tres fermentos estudiados, estreptolisina O, estreptoquinasa y proteinasa, por las 60 razas de estreptococos del grupo A, se resumen en forma sinóptica en los cuadros 1, 2 y 3. En ellos se puede observar que la producción de cada uno de estos fermentos es independiente de la de los restantes, no observándose asociaciones ni antagonismos entre ellos.

Se observa, además, que ninguno de los fermentos predomina o está ausente en los estreptococos aislados de alguno de los tres grupos de sujetos, no habiendo tampoco, por tanto, un patrón de producción de fermentos característico de cada enfermedad.

Esta falta de diferencias características en la producción de fermentos extracelulares por estreptococos hemolíticos grupo A de diferente origen se manifiesta aún con mayor claridad al hacer la distribución de frecuencias de cada título de actividad fermentativa dentro de los tres grupos en que se han incluido los estreptococos según su procedencia. Estas distribuciones de frecuencia se encuentran representadas

en forma de histograma en las gráficas 1, 2 y 3. Se ve cómo para la estreptolisina O predominan en los tres grupos los títulos de actividad comprendidos entre 4 y 64; para la estreptoquinasa, los títulos entre 2 y 8, y para la proteinasa, entre 0 y 2,5. Las pequeñas diferencias observadas entre unos y otros grupos para el mismo fermento no son estadísticamente significativas.

## CUADRO 1.

PRODUCCION DE FERMENTOS POR 25 RAZAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS DEL GRUPO A AISLADAS DE ENFERMOS CON PRIMER ATAQUE O RECIDIVA DE FIEBRE REUMATICA

Estrepto-coco	Diagnóstico	Estrepto-lisina O	Estrepto-quinasa	Pro-teinasa
22570	Recidiva	256	2	2,31
23663	"	64	2	0,97
23881	"	64	16	0
26208	"	32	4	0
27334	Primer ataque	8	8	0
27449	Recidiva	32	2	0
28455	"	128	4	0,60
28902	Primer ataque	16	8	0
29094	Recidiva	8	4	5,16
32279	"	64	1	9,41
32279 bis	"	64	1	2,13
32416	"	16	8	0
33503	Primer ataque	16	1	0
33654	"	8	8	0
34085	"	16	2	0
34317	Recidiva	8	4	2,01
34641	Primer ataque	16	2	0,8
34872	"	4	1	0
34874	Recidiva	16	0	8,64
34970	"	4	2	1,14
35052	"	8	64	0,8
35242	Primer ataque	4	4	2,0
35391	Recidiva	16	16	0
35599	"	16	2	0
35813	"	4	8	0

## CUADRO 2.

PRODUCCION DE FERMENTOS POR 10 RAZAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS DEL GRUPO A AISLADAS DE ENFERMOS CON INFECCIONES ESTREPTOCOCICAS AGUDAS NO COMPLICADAS

Estrepto-coco	Diagnóstico	Estrepto-lisina O	Estrepto-quinasa	Pro-teinasa
28901	Faringitis	64	8	0
29267	Erysipela	64	8	0
31474	Faringitis	64	8	1,23
32360	"	256	0	1,88
33091	"	8	2	4,70
33529	Nefritis aguda	0	4	2,13
33568	Faringitis	4	8	3,51
33620	Absceso glúteo	0	2	2,31
34730	Otitis	32	64	1,02
35317	Nefritis aguda	16	2	0

CUADRO 3.

## PRODUCCION DE FERMENTOS POR 25 RAZAS DE ESTREPTOCOCOS HEMOLITICOS DEL GRUPO A AISLADAS DE SUJETOS NORMALES Y CON DIVERSAS ENFERMEDADES

Estreptococo	Diagnóstico	Estreptolisina O	Estreptoquinasa	Proteínasa
3-303	Bronquitis	0	2	0
3-252	Asma	8	8	3,44
21998	Gota	128	0	0
22159	Normal	64	4	0
22289	Parálisis facial	32	4	0,52
22912	Nefritis crónica	32	4	2,28
23367	Parálisis facial	8	32	1,02
25000	Normal	64	4	0
25034	"	16	2	0
27223	"	64	2	2,42
27420	Púrpura	2	4	2,35
27775	Artritis tb.	16	4	0
27882	Púrpura	2	2	1,01
28090	Uveitis	64	0	4,92
28260	Normal	16	8	2,50
29351	"	8	8	1,17
30925	"	16	2	1,17
31227	Artritis reumatoide	64	4	0
32258	Nefritis crónica	64	4	0
32726	Normal	8	4	1,17
33116	"	4	8	0
33706	"	4	8	1,01
34575	"	8	0	0
35345	Artritis reumatoide	4	8	0
35869	Normal	16	4	1,17

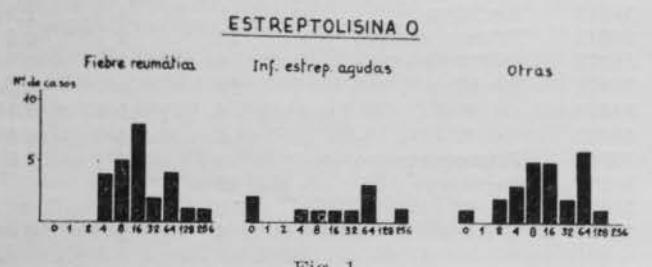


Fig. 1.

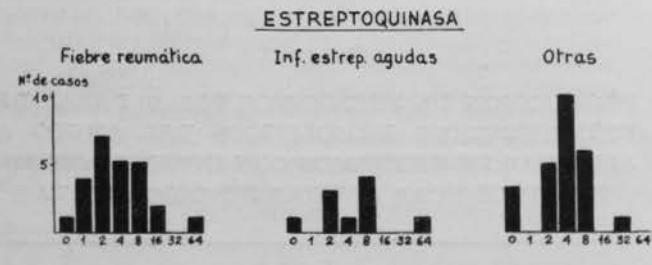


Fig. 2.

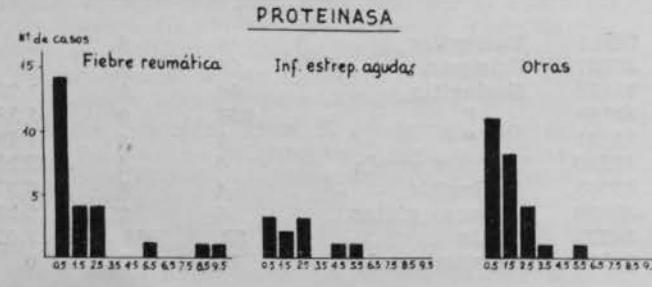


Fig. 3.

## DISCUSIÓN.

Los métodos desarrollados en este trabajo para la determinación de fermentos extracelulares estreptocócicos parecen ofrecer ciertas ventajas sobre métodos similares existentes en la literatura.

En cuanto a la determinación de estreptolisina O, el método empleado no difiere en lo esencial de los corrientemente en uso (TODD, 1938; RANTZ y RANDALL, 1945; HOWARD, WALLACE y WRIGHT, 1953). Su principal ventaja es el empleo del tioglicolato como reductor, con el cual no es necesario "madurar" la lisina en vacío o en atmósfera inerte, como cuando se usa el tionito sódico, ni emplear solución buffer para las diluciones, como en el caso de la cisteína. La lisina, reducida con tioglicolato, está lista para su uso inmediatamente y conserva su actividad inalterada durante varias semanas, sin tomar ninguna precaución especial, o durante varios meses si se conserva congelada a baja temperatura o cubierta de una capa de parafina que la aísla del aire. HOWARD, WALLACE y WRIGHT (1953) también hacen la reducción con tioglicolato, pero su método resulta más engorroso porque preparan la sal en el momento de su empleo, partiendo de ácido tioglicólico y sosa. Esto resulta bastante incómodo, especialmente cuando la estreptolisina O se destina a las determinaciones de rutina del título de antiestreptolisina en el suero de enfermos.

El método aquí empleado para la determinación de estreptoquinasa se basa en gran medida en el método de SEGOVIA y colaboradores (1957) para la determinación de antiestreptoquinasa. Difiere de éste fundamentalmente en que aquél es un método fibrinolítico y no fibrinogenolítico. Mientras que SEGOVIA y colaboradores hacen actuar el plasminógeno activado por la estreptoquinasa sobre el fibrinógeno solo, y añaden la trombina al final para que se produzca la coagulación del fibrinógeno no destruido, nosotros mezclamos el plasminógeno activado con el fibrinógeno y producimos inmediatamente la coagulación por la trombina, de tal manera que el ataque se hace sobre la fibrina. Hemos podido comprobar que esto aumenta considerablemente la sensibilidad de la prueba, que se hace aún mayor prolongando el tiempo de incubación. La apreciación del punto final de la reacción se puede hacer con toda precisión empleando la técnica modificada. Nosotros no hacemos titulación diaria de la actividad de la preparación de plasminógeno, porque hemos comprobado que cuando se prepara cuidadosamente, especialmente en lo que se refiere al ajuste exacto, potenciométrico, del pH y se emplea un exceso de plasminógeno, las ligeras variaciones de actividad que pueda haber de una preparación a otra no se traducen en modificaciones del título de la actividad del fermento. Otros cambios introducidos no tienen más finalidad que el ahorro de materiales y la simplificación del método.

Por lo que se refiere al método de determinación de proteinasa, hemos adoptado la gelatina como sustrato de la misma por su fácil preparación y porque da un punto final muy neto y resultados perfectamente reproducibles. No obtuvimos resultados satisfactorios con la prueba de coagulación de la leche, propuesta por ELLIOTT y DOLE (1947), quizá porque no todas las preparaciones de leche en polvo son buenas para la misma; ni con el método de determinación de la tirosina liberada de la caseína (ELLIOTT, 1950), ya que aunque esta determinación se hace por un método tan preciso como es el empleo del reactivo fenólico de Folin-Ciocalteu, se introduce una grosera fuente de error al tener que reconstituir el volumen después de la ebullición necesaria para eliminar el cianuro empleado para la activación del fermento, para la cual no se pueden usar sustancias reductoras (tioglicolato, cisteína, ditionito), que dan color azul con el reactivo de Folin-Ciocalteu.

COBURN y PAULI (1935) estudiaron veinte razas de estreptococos productoras y otras veinte no productoras de recidiva reumática, aisladas todas ellas de sujetos con historia previa de ataques agudos de fiebre reumática, sin encontrar diferencias entre ambos grupos de estreptococos en los caracteres culturales y fermentativos ni en las pruebas de producción enzimática: liquidación de la gelatina, digestión de la caseína, actividad histasa y actividad fibrinolítica. Estas últimas pruebas corresponden a nuestras determinaciones de proteinasa y de estreptoquinasa, respectivamente, y los resultados, en sus líneas generales, coinciden con los nuestros, si bien las técnicas empleadas fueron, como corresponde a la fecha de publicación del trabajo, menos exactas y sólo groseramente cuantitativas. En cuanto a sus pruebas de liquidación de la gelatina y de digestión de la caseína, aunque basadas en el ataque a un sustrato proteico, no tienen nada que ver con la proteinasa estreptocócica posteriormente descrita por ELLIOTT (1945), ya que faltaron en absoluto las condiciones de reducción necesarias para la acción de este fermento, siendo quizás esta la razón por la que sus resultados son pobres en el caso de la caseína y totalmente negativos en el de la gelatina.

Comentario especial merece el hallazgo de estos mismos autores de la producción de estreptolisina O por casi todos los estreptococos que desencadenaron una recidiva reumática, y su falta de producción por más de la mitad de los estreptococos incapaces de reactivar el proceso reumático. Nuestros resultados difieren en varios aspectos. En primer lugar, nosotros sólo hemos encontrado 3 de 60 estreptococos en que no se pudo demostrar producción de estreptolisina, mientras que en el trabajo citado esto ocurrió en 15 de las 40 razas probadas. Esto significaría una mayor sensibilidad de nuestro método. En segundo lugar, como queda dicho, nosotros no hemos encontrado diferencias en la producción de estreptolisina relacionada con

la procedencia de la raza bacteriana. Aunque las técnicas de COBURN y PAULI y las nuestras no son exactamente coincidentes, no parece que la discrepancia en los resultados pueda ser atribuible a este factor. Un hecho, sin embargo, hay que resaltar. Aunque los autores dicen haber hecho determinaciones del poder hemolítico y del poder combinante de la lisina y de la cantidad de antiestreptolisina necesaria para la neutralización, sólo dan los resultados de esta última, relacionada con el poder combinante y no con el hemolítico de la estreptolisina O. Como ya se dijo, en nuestras manos ambas actividades fueron casi exactamente paralelas, pero esto no es siempre así (HODGE y SWIFT, 1933) y podría no haberlo sido con los métodos empleados por los autores citados. Naturalmente, ésta es sólo una posibilidad que no puede afirmarse ni excluirse sin disponer de los datos completos.

Recientemente, HARDIN, QUINN y AVERY (1956) han estudiado trece características biológicas de cada una de 86 razas de estreptococos aisladas de sujetos con diversos diagnósticos. Entre estas características biológicas está incluida la producción de los tres fermentos estudiados en el presente trabajo. Nuestros resultados no coinciden enteramente con los suyos, sobre todo en que ellos sólo encuentran una reducida proporción de estreptococos productores de proteinasa, quizás porque emplean para su determinación el método de Elliott de la coagulación de la leche, que en nuestras manos ha resultado ser menos sensible que el de liquidación de la gelatina. Sin embargo, hay acuerdo absoluto entre sus resultados y los nuestros en que no hay relación entre la producción de estos fermentos y el proceso del enfermo del que se aisló el estreptococo. Tampoco encuentran tal relación en las restantes características biológicas estudiadas. A semejante conclusión, por lo que se refiere al tipo serológico de los estreptococos, llegan RAMMELKAMP, DENNY y WANAMAKER (1952), entre otros autores.

Todos estos datos nos llevan a la conclusión de que no existen diferencias entre los estreptococos que desencadenan un brote agudo de fiebre reumática y los que son inactivos desde este punto de vista; el mismo estreptococo podría o no producir fiebre reumática aguda según la manera como el sujeto infectado respondiese a la infección.

Esta interpretación de los hechos está, sin embargo, sometida a dos serias limitaciones:

a) La producción de fermentos por los estreptococos *in vitro* puede no ser comparable a su formación en el organismo infectado. WATSON y CROMARTIE (1952) han demostrado la producción *in vivo* (en conejos) de hialuronidasa por estreptococos grupo A incapaces de formarla *in vitro*. Cabe pensar que diferencias semejantes ocurran en otros fermentos.

b) Hasta el presente no se ha demostrado que ninguno de los fermentos aquí estudiados,

ni ningún otro, intervenga activamente en la producción del brote de fiebre reumática. Estreptococos iguales en todos los demás aspectos podrían diferenciarse entre sí en algún producto extra o intracelular que fuese directamente responsable de la producción del ataque reumático. Recientemente, MATHESON y REED (1959) han demostrado que la propiedad nefritogénica de los estreptococos tipo 12 no radica en ninguno de los fermentos conocidos, sino en polipéptidos presentes en el caldo de cultivo, que, pese a su peculiar actividad biológica, no han podido ser hasta ahora diferenciados biofísica o bioquímicamente de los producidos por estreptococos no nefritogénicos. Aunque la relación entre estreptococo y nefritis no es la misma que entre estreptococo y fiebre reumática, cabe pensar que un producto estreptocócico todavía no conocido sea de fundamental importancia en esta última enfermedad.

Sin perder de vista estas dos objeciones, puede concluirse que la negatividad de los resultados aquí enumerados parece ser un dato más en apoyo de la idea de que el desarrollo de la fiebre reumática en sólo un porcentaje reducido de los sujetos que han sufrido recientemente una infección estreptocócica depende de la peculiar respuesta del huésped y no de la toxigenicidad de algunos estreptococos.

#### RESUMEN.

Se desarrollan métodos adecuados para medir la producción *in vitro* de estreptolisin O, estreptoquinasa y proteinasa por los estreptococos hemolíticos del grupo A.

Se determina la formación de estos fermentos por 25 razas de estreptococos grupo A aisladas de enfermos con fiebre reumática, 10 de enfermos con infecciones estreptocócicas no complicadas y 25 de sujetos normales o con procesos diversos, accidentalmente portadores de estreptococos del grupo A.

No se ha podido demostrar ninguna relación entre la producción de ninguno de estos fermentos y la capacidad de los estreptococos para producir fiebre reumática. Tampoco hay relación entre los títulos de estos tres fermentos para cada estreptococo.

Con ciertas limitaciones que se señalan, los resultados pueden tomarse como prueba indirecta de que el desarrollo de fiebre reumática en sólo un reducido número de sujetos con infecciones estreptocócicas es debido a la peculiar manera de reaccionar del huésped, más bien que a especiales condiciones del agente infectante.

#### BIBLIOGRAFIA

- COBURN, A. F., y PAULI, R. H.—*J. Clin. Invest.*, 14, 755, 1935.  
 ELLIOT, S. D.—*J. exp. Med.*, 81, 573, 1945.  
 ELLIOT, S. D.—*J. exp. Med.*, 92, 201, 1950.  
 ELLIOT, S. D., y DOLE, V. P.—*J. exp. Med.*, 85, 305, 1947.  
 HARDIN, R. H.; QUINN, R. W., y AVERY, R. T.—*J. infec. Dis.*, 99, 84, 1956.
- HODGE, B. E., y SWIFT, H. F.—*J. exp. Med.*, 58, 277, 1933.  
 HOWARD, J. G.; WALLACE, K. R., y WRIGHT, G. P.—*Brit. J. exp. Path.*, 34, 174, 1953.  
 LANCEFIELD, R. C.—*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 38, 473, 1938.  
 MATHESON, B. H., y REED, R. W.—*J. infec. Dis.*, 104, 213, 1959.  
 MAXTED, W. R.—*J. Clin. Path.*, 6, 224, 1953.  
 MILSTONE, H.—*J. Immunol.*, 42, 109, 1941.  
 RAMMELKAMP, C. H.; DENNY, F. W., y WANNAMAKER, L. W.—En "Rheumatic fever. A Symposium". Editado por L. Thomas, University of Minnesota Press, Minneapolis, 1952.  
 RANTZ, L. A., y RANDALL, E.—*Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 59, 22, 1945.  
 SEGOVIA, J. M.; ORTEGA, A.; JIMÉNEZ CASADO, M.; PARÍS, L.; OUTEIRIÑO, J., y ALÉS, J. M.—*Rev. Clin. Esp.*, 66, 151, 1957.  
 SLADE, H. D., y KNOX, G. A.—*J. Bacter.*, 60, 301, 1950.  
 TODD, E. W.—*J. Path. Bacter.*, 47, 423, 1938.  
 TODD, E. W., y HEWITT, L. F.—*J. Path. Bacter.*, 35, 973, 1932.  
 WATSON, D. W., y CROMARTIE, W. J.—En "Rheumatic Fever. A Symposium". Editado por L. Thomas, University of Minnesota Press, Minneapolis, 1952.

#### SUMMARY

Appropriate methods for measuring the "in vitro" production of streptolysin O, streptoquinase and proteinase by the hemolytic streptococci of the Group A are developed.

The formation of these enzymes is determined through 25 streptococcus breeds of the group A isolated from patients with rheumatic fever, 10 patients with streptococcal infection of an uncomplicated character and 25 normal subjects or persons with different processes, accidental carriers of streptococci of the group A.

No relation has been proved between the production of any of these enzymes and the capacity of the streptococci of producing rheumatic fever. Nor is there any relation between the titers of these three enzymes for each streptococcus.

Under certain conditions which are pointed out the results can be taken as an indirect proof that the development of rheumatic fever at only a reduced number of persons with streptococcal infections is due to the peculiar way in which the host reacts rather than to special conditions of the infecting agent.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Es werden zweckmässige Methoden ausgearbeitet um die Produktion an Streptolysin O, Streptokinase und Proteinase der hämolytischen Streptokokkus, Gruppe A *in vitro* zu bestimmen.

Fünfundzwanzig Streptokokusgattungen, Gruppe A, die von Patienten mit reumatischen Fieber, 10 Kranken mit unkomplizierten Streptokokkusinfektionen und 25 normalen oder an verschiedenen Prozessen leidenden Personen, sowie akzidentellen Streptokokkusträgern der Gruppe A herührten wurden hinsichtlich der Produktion dieser Fermente geprüft.

Es konnte bei diesen Streptokokken keine Beziehung zwischen Fermentbildung und Lösungsfähigkeit eines rheumatischen Fiebers nachgewiesen werden. Auch bestand keine Beziehung zwischen der Titrierung dieser drei Fermente bei den einzelnen Streptokokken.

Mit gewissen Beschränkungen (auf welche hingewiesen wird) können die Ergebnisse als indirekter Beweis dafür angesehen werden, dass die Tatsache, dass bloss eine beschränkte Anzahl der Kranken mit Streptokokkusinfektionen ein rheumatisches Fieber entwickeln, mehr auf die eigenartige Reaktion des Kranken, als auf die besonderen Bedingungen des infizierenden Erregers zurückzuführen ist.

### RÉSUMÉ

Développement des méthodes adéquates pour mesurer la production "in vitro" de streptolysine O, streptoquinase et protéinase par les streptocoques hémolytiques du groupe A. On détermine la formation de ces ferments par 25 espèces de streptocoques groupe A isolées des malades avec fièvre rhumatique, 10 malades avec infections streptococciques non compliquées et 25 sujets normaux ou avec des procès différents, accidentellement porteurs de streptocoques du groupe A.

On n'a pu démontrer aucun rapport entre la production d'aucun de ces ferments et la capacité des streptocoques pour produire la fièvre rhumatique. Il n'a pas non plus de rapport entre les titres de ces trois ferments pour chaque streptocoque.

Avec certaines limitations qui se signalent, on peut considérer les résultats comme une preuve indirecte de que le développement de fièvre rhumatique se produit seulement dans un petit nombre de cas avec infections streptococciques, par la manière spécial dont réagissent les malades plutôt qu'aux conditions spéciales de l'agent infectant.

diantes de biotipo asténico, la frecuencia con que encontramos reacciones hiperérgicas a la tuberculina (10,7 por 100) fue aproximadamente la mitad de lo encontrado en el biotipo asténico (20,5 por 100). Tratando de aclarar este hecho, escribimos en aquel entonces: "La morfología asténica no sería sino la expresión de un estado general de hipofunción reaccional. Los pínicos, en cambio, muestran una irritabilidad singular y, en especial, una sensibilidad particular de su piel y sus mucosas en los primeros años de la vida, que luego se extiende a una serie de sistemas y de órganos. Para designar esta capacidad de reacción aumentada, hace muchos años ya que BORCHARDT propuso la denominación de constitución irritable. La mayor frecuencia de reacciones hiperérgicas observadas por nosotros en los pínicos no sería más que un ejemplo de la mayor reactividad que, en general, y frente a una serie de estímulos, presenta esta clase de individuos. En realidad, quien estaría dotado de una mayor reactividad sería el sistema vegetativo. En los primeros, el mayor desarrollo de los cráneos del vegetativo (cavidades esplácnica y torácica) motivarían que las respuestas del vegetativo fuesen más energicas y, como en último término, la inmensa mayoría de los factores, tanto específicos como inespecíficos que influencian la reacción tuberculínica, los harían a través de este sistema, nada de particular tiene que en el hábito hipoplásico, con una tendencia hipofuncional y un menor desarrollo del vegetativo, en relación con el sistema nervioso de la vida de relación, hayamos observado menor frecuencia de reacciones hiperérgicas que en los incluidos en el hábito atlético y pícnico."

En las pruebas tuberculínicas realizadas entre estudiantes, con ocasión de cursar el primer curso en la Universidad de Madrid, también pudimos ver como la intensidad de la reacción guardaba relación con el color del pelo. La curva de frecuencia de reacciones hiperérgicas en los estudiantes pelirrojos, con pelo rubio, castaño y con pelo negro iban disminuyendo progresivamente de los pelirrojos a los estudiantes de pelo negro.

Así, mientras encontramos un 40 por 100 de reacciones intensamente positivas al Pirquet en los pelirrojos, fue solamente de un 14 por 100 en los de pelo castaño y un 16 por 100 en los de pelo negro, y un 20 por 100 en los rubios. La frecuencia con que se encuentran estos distintos colores de pelo fue precisamente la inversa: castaño, 65,9 por 100; negro, 20,1 por 100; rubio, 13 por 100; rojo, 0,6 por 100. SCHRODER, hace ya años que señaló que el pigmento melánico ejercía una cierta acción inhibitoria sobre la respuesta del cutis a la tuberculina.

Para terminar, en el estudio de la influencia de factores ajenos a la infección tuberculosa y de naturaleza constitucional y ambiental, citemos el hecho ya observado por varios clínicos sobre la mayor frecuencia de reacciones tuberculínicas en primavera y que uno de nosotros ha

### CORTICOTERAPIA Y ALERGIA TUBERCULINICA

J. y A. ZAPATERO, F. GARCÍA MORENO, J. M. MONTEROL, F. CAMARERO y J. A. BLANCO RODRÍGUEZ.

Servicio de Aparato Respiratorio del Hospital General de Madrid.

Profesor: Dr. JOSÉ ZAPATERO.

La mayor o menor intensidad en el grado de respuesta a la tuberculina está condicionada no solamente por factores meramente infectivos (quantum de la infección, estadio de la misma, etc.), sino también por factores constitucionales ajenos a la infección en sí. En una publicación hecha hace quince años por uno de nosotros llamábamos la atención sobre la importancia de estos últimos factores. En los estu-