

**UNIVERSIDAD
DE
GRANADA**

**C.S.VIRGEN DE LAS NIEVES
SERVICIO DE MICROBIOLOGIA**

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

**INFLUENCIA DE LA COMPOSICION
DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA
LA PRODUCCION DE PIGMENTO POR
*STREPTOCOCCUS AGALACTIAE***



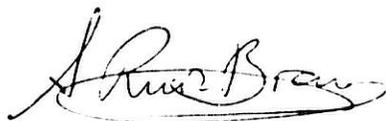
**C.Carazo Carazo
Granada, 1993**

EL DR. D. ALFONSO RUIZ-BRAVO LOPEZ, PROFESOR TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE GRANADA Y EL DR. D. MANUEL DE LA ROSA FRAILE, JEFE DEL SERVICIO DE MICROBIOLOGIA DE LA CIUDAD SANITARIA VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral que presenta la Licenciada, Dña. Concepción Carazo Carazo, "INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO SOBRE LA PRODUCCION DE PIGMENTO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*", ha sido realizada bajo nuestra dirección en condiciones que la hacen acreedora del Título de Doctor en Farmacia.

Granada, Noviembre de 1993



Fdo. Dr. A. Ruiz-Bravo López



Fdo. Dr. M. de la Rosa Fraile

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos cuantos han hecho posible la realización de este trabajo:

Al Dr. D. Manuel de la Rosa Fraile, Jefe del Servicio de Microbiología de la Ciudad Sanitaria "Virgen de las Nieves" de Granada, Director de esta Tesis Doctoral, por iniciarme en la labor investigadora durante mis años de formación como residente brindándome la oportunidad y medios necesarios para su realización, por la confianza que depositó en mí y por su gran dedicación y constante ayuda en cuantos problemas han surgido en el desarrollo de la misma.

Al Dr. D. Alfonso Ruiz-Bravo López, profesor titular del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada, por la dirección de esta Tesis, inestimable ayuda y apoyo incondicional que han hecho posible que pudiera llevarse a cabo.

Quisiera nombrar aquí a todos mis compañeros: Adjuntos, Residentes, Becarios, por su comprensión, valiosa aportación de ideas y estímulo que siempre me han ofrecido. Al personal de Enfermería, Técnico, Auxiliar y Administrativo del Servicio de Microbiología de "Virgen de las Nieves" que han colaborado de forma totalmente desinteresada en la realización de este trabajo.

Al Dr. D. José Liébana Ureña, como Tutor del Programa de Doctorado.

A Javier Galván y M^a Carmen Rueda por su colaboración en la fotografía.

A mis amigos, por haber estado a mi lado ayudándome a superar las dificultades y contratiempos día a día y a quienes difícilmente podré agradecer la ayuda que me han prestado, pero ante todo, por su amistad.

Quisiera mencionar también, a las personas allegadas a mi entorno familiar por la comprensión que me han demostrado en los momentos de desánimo.

Han sido muchos otros los que me han ayudado y apoyado y ante la imposibilidad de enumerarlos individualmente, a todos muchas gracias.

A mi familia

INDICE

INDICE**1. INTRODUCCION****1.1. Aspectos generales de *Streptococcus agalactiae***

1.1.1. Nomenclatura	6
1.1.2. Revisión histórica	6
1.1.3. Características morfológicas y bioquímicas	9
1.1.4. Características nutricionales	11
1.1.5. Cepas de origen humano - animal	13
1.1.6. Productos bacterianos	14
1.1.7. Composición antigénica	14
1.1.8. Identificación	17
1.1.9. Epidemiología y transmisión	
1.1.9.1. Colonización	18
1.1.9.2. Transmisión	21
1.1.10. Clínica de las infecciones por EGB	
1.1.10.1. Infección neonatal	22
1.1.10.2. Infección en adultos	25
1.1.11. Tratamiento	26
1.1.12. Profilaxis	29
1.2. Revisión del pigmento producido por <i>Streptococcus agalactiae</i>	
1.2.1. Antecedentes y estado actual	32
1.2.2. Naturaleza y espectro de absorción	37
1.2.3. Condiciones y características de aparición del pigmento	
1.2.3.1. Influencia de la composición del medio de cultivo	38
1.2.3.2. Efecto del pH del medio	43
1.2.3.3. Efecto de la temperatura y atmósfera de incubación	44
1.2.4. Relación hemólisis-pigmento	44

1.3. Componentes de medios de cultivo que influyen en la producción de pigmento por <i>Streptococcus agalactiae</i>	
1.3.1. Almidón	
1.3.1.1. Estructura básica	45
1.3.1.2. Tipos de almidones	47
1.3.1.3. Propiedades del almidón y sus fracciones	48
1.3.1.4. Hidrólisis enzimática del almidón.....	51
1.3.2. Proteosa peptona	
1.3.2.1. Hidrolizados proteicos como constituyentes de medios de cultivo bacterianos	53
1.3.2.2. Proteasas empleadas en la preparación de digestos proteicos.	56
1.3.2.3. Análisis y caracterización de los hidrolizados proteicos	57
1.3.3. Suero	
1.3.3.1. Suero como constituyente de medios de cultivo bacterianos.	62
2. OBJETIVOS	64
3. MATERIAL Y METODOS	
3.1. Cepas bacterianas	65
3.2. Medio de cultivo base	66
3.3. Estudio de la influencia de los componentes del Medio Base sobre la formación de pigmento por <i>S. agalactiae</i>	
3.3.1. Metodica de trabajo	67
3.3.2. Eliminación individualizada de cada uno de los componentes del MB.	69
3.3.3. Variación en la composición del medio base por eliminación de algunos de sus componentes	69

3.4 Estudio de almidón como constituyente del Medio Base	
3.4.1. Modelo experimental	71
3.4.2. Actividad de almidón (Merck 1252) sobre la formación de pigmento por <i>S.agalactiae</i>	72
3.4.3. Actividad de diversos almidones y de sus fracciones	73
3.4.4. Actividad de hidrolizados enzimáticos de almidón por acción de β -amilasa	74
3.4.5. Formación de complejos con yodo	76
3.4.6. Influencia de almidón sobre el espectro de absorción del pigmento .	77
3.4.7. Actividad de Albúmina en la pigmentación de EGB	77
3.4.8. Actividad de diversos carbohidratos sobre la formación de pigmento por EGB	78
3.5. Estudio de Proteosa Peptona como constituyente del Medio Base	
3.5.1. Modelo experimental	80
3.5.2. Actividad de Proteosa Peptona N°3 (Difco) sobre la formación de pigmento por EGB	82
3.5.3. Actividad de otros hidrolizados proteicos	88
3.5.4. Actividad de Acidos Nucleicos	89
3.5.5. Actividad de Vitaminas	89
3.5.6. Actividad de Aminoácidos	91
3.5.7. Actividad de Extracto de Levadura	93
3.6. Estudio de Suero como constituyente del Medio Base	
3.6.1. Modelo experimental	94
3.6.2. Actividad de suero de caballo (SR-35 Oxoid) sobre la formación de pigmento por <i>S.agalactiae</i>	95
3.6.3. Actividad del plasma humano, sueros de diferentes procedencias y fracciones del suero	96
3.6.4. Actividad del suero humano sobre la pigmentación de EGB	97

3.6.5. Actividad de Líquidos Orgánicos sobre la pigmentación de EGB.....	101
--	-----

4. RESULTADOS

4.1. Experiencias preliminares

4.1.1. Condiciones de incubación	102
4.1.2. Influencia de la composición del Medio de cultivo en la formación de pigmento por <i>S.agalactiae</i>	108

4.2. Estudio de Almidón como constituyente de medios de cultivo para pigmentación de *S.agalactiae*

4.2.1. Actividad de almidón y sus fracciones sobre la formación de pigmento por EGB	109
4.2.2. Actividad de hidrolizados de almidón por acción de β -amilasa	112
4.2.3. Actividad de albúmina sobre la pigmentación de EGB	115
4.2.4. Capacidad de complejar yodo	116
4.2.5. Influencia de la incorporación de almidón sobre el espectro de absorción del pigmento de EGB	118
4.2.6. Actividad de otros carbohidratos sobre la formación de pigmento por <i>S.agalactiae</i>	120

4.3. Estudio de Proteosa Peptona como constituyente de medios de cultivo para pigmentación de *S.agalactiae*

4.3.1. Actividad de Proteosa Peptona (PP N°3 Difco) sobre la formación de pigmento de EGB	124
4.3.2. Actividad de otros hidrolizados proteicos en la pigmentación	129
4.3.3. Actividad de Vitaminas	138
4.3.4. Actividad de Acidos Nucleicos	139
4.3.5. Actividad de Aminoácidos	139
4.3.6. Actividad de Extracto de Levadura en la formación de pigmento....	141

4.4. Estudio del Suero como constituyente de medios de cultivo para pigmentación de <i>S. agalactiae</i>	
4.4.1. Actividad de suero de caballo (SR-35 Oxoid) sobre la formación de pigmento por EGB	144
4.4.2. Actividad de plasma humano, sueros de diferentes procedencias y fracciones de éste	145
4.4.3. Actividad de Suero Humano sobre la pigmentación de EGB	146
4.4.4. Actividad de otros fluidos biológicos sobre la producción de pigmento por EGB	150
5. DISCUSION	152
6. CONCLUSIONES	169
7. BIBLIOGRAFIA	171

INTRODUCCION

1. INTRODUCCION

1.1. ASPECTOS GENERALES DE *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

1.1.1. Nomenclatura

Streptococcus agalactiae, es la denominación de especie para los estreptococos que contienen el antígeno carbohidrato grupo B de Lancefield (Jelinková and Motlová, 1985a; Hardie, 1986; Henrichsen, 1985).

La primera denominación utilizada para este microorganismo fue *S.nocardi*, aunque otros sinónimos empleados han sido: *S.mastitis contagiosae*, *S.mastitis sporadicae*, *S.agalactiae contagiosae*, *S.agalactiae*, *S.mastitidis*. La actual denominación de especie (*S.agalactiae*), es debida a Lehmann y Neuman y data de 1896, aunque fue propuesta en 1947 por Brown en el 4º Congreso Internacional de Microbiología siendo la aceptada oficialmente desde 1954 (Jelinková and Motlová, 1985a; Hardie, 1986).

Debido a que la identificación de *S.agalactiae*, se realiza habitualmente por métodos serológicos, se emplea frecuentemente el término "estreptococo del grupo B" y de forma abreviada "EGB".

1.1.2. Revisión histórica

El término *Streptococcus* fue aplicado por primera vez en 1877 por Billroth y Ehrlich, para describir cocos formadores de cadenas observados en infecciones de heridas. En 1884, Rosenbach (Topley and Wilson's, 1975), dio el nombre de *Streptococcus pyogenes* a cocos que crecían en cadenas y que se aislaron de lesiones supurativas humanas. Unos años más tarde, en 1887, Nocard y Mollereau (Ross, 1984; Topley and Wilson's, 1975) describieron el aislamiento de estreptococos con propiedades similares a las de *S.agalactiae* en vacas con una forma de mastitis

contagiosa, estableciendo así una relación causal.

Marmorek en 1895 (Topley and Wilson's, 1975), observó la capacidad de algunos estreptococos para lisar eritrocitos y Schottmuller en 1903 (Topley and Wilson's, 1975) propuso que esta capacidad para causar hemólisis "in vitro" debería usarse como sistema de clasificación de estreptococos.

Smith y Brown en 1915 (Topley and Wilson's, 1975) describieron los distintos tipos de cambios producidos por estos microorganismos en placas de agar sangre y en 1919 Brown (McCarty, 1980) introdujo los términos alfa, beta y gamma hemólisis encontrando que tanto los estreptococos de origen humano como bovino pertenecían al tipo β -hemolítico. Posteriormente, Ayers y Rupp en 1922, diferenciaron EGB de otros estreptococos β -hemolíticos por su capacidad para hidrolizar hipurato sódico (Henrichsen, 1985).

Hitchcock en 1924 (Ross, 1984; Topley and Wilson's, 1975) fue el primero en demostrar que la mayoría de los estreptococos procedentes de infecciones humanas poseían un antígeno polisacárido activo serológicamente.

Lancefield definió 2 antígenos carbohidratos de pared celular para EGB: el antígeno de grupo B o sustancia "c" común a todas las cepas de este serogrupo y el antígeno tipo específico o sustancia "s" que permite su posterior clasificación en serotipos. De este modo, Lancefield en 1933 demostró que la mayoría de las cepas β -hemolíticas patógenas para el hombre pertenecían al grupo A y que las cepas β -hemolíticas aisladas de vacas tenían un polisacárido distinto y se clasificaron como grupo B. Este sistema de clasificación está basado en la reacción de precipitación capilar entre el antígeno carbohidrato grupo específico solubilizado por tratamiento ácido de los microorganismos, con antisueros hiperinmunes preparados por inmunización de conejos con células enteras tratadas con formol (Lancefield, 1933).

Stableforth en 1932 (Topley and Wilson's, 1975) demostró la existencia de tipos serológicos en EGB. En 1934, Lancefield (Ross, 1984), describió 3 serotipos de EGB basándose en los antígenos polisacáridos tipo-específicos: I, II y III, y 4 años más tarde subdividió el serotipo I en Ia y Ib (Topley and Wilson's, 1975). El 5º serotipo caracterizado por Wilkinson y Eagon en 1971 e históricamente designado

como Ic, presenta el mismo antígeno polisacárido que el serotipo Ia y el antígeno proteico c (Wilkinson and Eagon, 1971). Lancefield demostró que un determinante antigénico menor el polisacárido tipo labc era común a muchas cepas tipo I (Edwards and Baker, 1990).

En 1979, Perch y col. describieron el serotipo IV, posteriormente aislado y caracterizado por Wessels y col. en 1989 (Perch et al., 1979; Wessels et al., 1989). Recientemente se ha definido el polisacárido capsular tipo V, encontrándose bajo investigación varios nuevos serotipos (Jelinková and Motlová, 1985b; Motlová et al., 1986; Wessels et al., 1991).

Pattison, Matthews y Maxted en 1955, añadieron al perfil serológico de EGB los antígenos proteicos R y X, utilizados más tarde por Stableforth como sistema de clasificación de los tipos de EGB (Topley and Wilson's, 1975).

Streptococcus agalactiae fue considerado como saprofito de vagina hasta que en 1935 Lancefield y Hare, relataron la presencia de este microorganismo en cultivos vaginales de mujeres postparto y que ocasionalmente fueron asociados con fiebre durante este periodo (Edwards and Baker, 1990).

El primer caso de sepsis puerperal fatal por *Streptococcus agalactiae* fue descrito en 1937 por Colebrook y Purdie aunque fue Fry en 1938 (Topley and Wilson's, 1975; Ross, 1984; Dillon et al., 1985) quien llamó la atención sobre EGB como causa de infecciones postparto, relatando 3 casos de sepsis puerperal fatal.

Brown en 1939, fue el primero en describir a EGB como patógeno urinario y neonatal tras su aislamiento en sangre de tres neonatos post-mortem donde se sugirió el tracto urinario como posible origen de la bacteriemia. En 1964, Eickhoff y col. describieron 3 casos de pielonefritis y 1 caso de bacteriemia por este microorganismo.

Meningitis en recién nacidos causadas por EGB se relataron en 1941 por Plummer, 1943 por Wheeler y Foley, 1958 por Nyhan y Fousek. Unos años más tarde, Hood y col. enfatizaron la posible relación entre colonización vaginal por EGB y aborto, prematuridad, muerte perinatal y enfermedad neonatal (Franciosi et al., 1973; Dillon et al., 1985; Ross, 1984).

A pesar de esto, la infección humana por EGB se consideró infrecuente, hasta que a principios de 1960, varios autores indicaron que la enfermedad debida a este microorganismo era más común de lo que se había considerado. Es a partir de 1970, cuando incrementa la importancia de EGB como patógeno humano, llegando a ser una causa frecuente de infecciones neonatales y maternas relacionadas con el puerperio (Baker and Edwards, 1990; Fischer, 1983; Edwards and Baker, 1990). Las razones que justifican este aumento en la incidencia de las infecciones por este microorganismos no estan claras (Baker, 1977a; Baker and Edwards, 1990; Easmon, 1986a).

Este incremento en las infecciones neonatales tambien se acompañó de un aumento en las infecciones de adultos, por lo que *S.agalactiae*, además de un importante patógeno neonatal es considerado hoy día como patógeno oportunista en adultos comprometidos por quimioterapia, diabetes mellitus, enfermedad hepática o embarazo (Edwards and Baker, 1990; Cueto, 1989; Baker and Edwards, 1990).

1.1.3. Características morfológicas y bioquímicas

Se presentan como células esféricas u ovoides de 0,6 - 1,2 μm de diámetro gram positivas, inmóviles, no esporuladas, anaerobias facultativas, que crecen formando cadenas características cuya longitud está en relación inversa a la riqueza del medio de cultivo (Hardie, 1986).

Las colonias de EGB, tras 18-24 horas de incubación tienen de 3-4 mm de diámetro, son lisas de bordes enteros, gris perla o blanquecinas y bastante blandas al tocarlas con un asa de inoculación (Facklam and Washington, 1991). En placas de agar sangre, las colonias generalmente aparecen rodeadas de una zona pequeña de β hemólisis, aunque el 2-3% de las cepas carecen de esta actividad (Patterson and Hafeez, 1976; Henrichsen, 1985; Sonnenwirth, 1983; Facklam and Washington, 1991).

Se ha observado que EGB, puede mostrar varios tipos de hemólisis: β (con una zona de lisis muy pequeña), α (de doble zona), o no hemólisis (Hardie, 1986);

el tipo y extensión de la hemólisis, está influenciada por la composición del medio base, el tipo y concentración de sangre usada y las condiciones del cultivo (Hardie, 1986).

Catalasa y oxidasa negativos, generalmente resistentes a bacitracina (aunque algunas cepas ocasionalmente son susceptibles a la misma), hidrolizan hipurato pero no esculina, combinación característica que diferencia EGB de otros estreptococos (Facklam et al., 1974), crecen en caldo 6,5% CINa especialmente después de 48 horas de incubación, así como en agar con 40% de bilis (Facklam and Washington, 1991; Hardie, 1986; McCarty, 1980; Henrichsen, 1985; Waitkins, 1980).

Fermentan glucosa, maltosa, sacarosa y casi todas las cepas, también trehalosa y glicerol (Hardie, 1986; Henrichsen, 1985); no producen ácidos a partir de sorbitol, arabinosa, xilosa, rafinosa, inulina y manitol. La producción de ácido a partir de salicina es variable y solamente un 5-6% de las cepas humanas son capaces de formar ácido a partir de lactosa (Kjems et al., 1980; Henrichsen, 1985) aunque aproximadamente el 99% de las cepas de origen bovino presentan esta propiedad (Henrichsen, 1985).

La mayoría de las cepas de *S. agalactiae*, hemolíticas o no, producen una proteína extracelular termoestable, conocida como factor CAMP. Un pequeño número de cepas de EGB pueden ser CAMP negativas pero las cepas no hemolíticas, habitualmente dan una reacción positiva, ya que no existe relación entre este factor y la hemolisina estreptocócica (Ferrieri, 1985a; Henrichsen, 1985; Marchlewicz and Duncan, 1980).

La prueba CAMP, para identificación presuntiva de EGB, fue descrita en 1944 por Christie, Atkins y Munch-Petersen (McFaddin, 1980), poniéndose de manifiesto mediante ella la hemólisis sinérgica entre una β -toxina de *Staphylococcus aureus* (esfingomielinasa C) y este factor estreptocócico en sangre de oveja o vacuna. El factor CAMP no es específico de EGB, puesto que puede producirse en cepas de otros grupos como C, F y G (Hardie, 1986). Se han realizado modificaciones de

esta prueba que permiten una identificación más rápida de EGB que la original (Darling, 1975; Dispersio et al., 1985, Ratner et al., 1986).

La producción de este factor estreptocócico también puede emplearse en la identificación presuntiva de *Clostridium perfringens* mediante la reacción denominada "reverse CAMP", en la que se observa una hemólisis sinérgica en agar sangre humana, entre EGB y una α -toxina producida por *C. perfringens* (Hansen and Elliott, 1980; Ferrieri, 1985a).

Otro criterio utilizado en la identificación presuntiva de EGB, es la resistencia al trimetoprim-sulfametoxazol (SxT), debido a su capacidad de utilizar la timidina presente en los medios de cultivo, anulando el bloqueo de la vía del ácido fólico (Coll et al., 1985; Facklam and Washington, 1991; Gunn, 1976).

1.1.4. Características nutricionales

En 1943, Nivin determinó los requerimientos nutricionales de varias cepas humanas y bovinas de EGB en un medio químicamente definido, encontrando una gran homogeneidad en sus requerimientos vitamínicos (Baker and Edwards, 1990).

Otros estudios realizados sobre una gran variedad de medios de cultivo indican que EGB es totalmente homogéneo en sus requerimientos de aminoácidos durante el crecimiento en condiciones aerobias y anaerobias con muy pocas excepciones (Willett et al., 1967; Milligan et al., 1978a). Fenilalanina, tirosina, triptófano, glutamato, arginina, valina, leucina, lisina, metionina, isoleucina, cistina e histidina son requeridos por la mayoría de las cepas. Algunas cepas del serotipo III requieren serina, y las necesidades de glicina varían de una cepa a otra (Milligan et al., 1978a).

Podemos decir que, EGB es un microorganismo con pocos requerimientos nutricionales, y que puede desarrollarse en medios de cultivo relativamente simples, aunque el enriquecimiento con sangre, suero o glucosa favorece su crecimiento (Facklam and Washington, 1991).

En medios líquidos, las cepas formadoras de cadenas generalmente originan un crecimiento granular con un depósito pulverulento o flocular y un líquido sobrenadante claro. El crecimiento es favorecido por la adición de glucosa, pero el pH baja rápidamente y cesa el crecimiento (Topley and Wilson's, 1975). Esta caída del pH se debe a una acumulación de ácido láctico, procedente de la fermentación de los azúcares, especialmente de la glucosa (McCarty, 1980).

En medios tamponados, con glucosa (Todd-Hewitt) o en medios con un elevado contenido en ésta, al que continuamente se añade álcalis durante el crecimiento, se obtiene un rendimiento algo mayor (Topley and Wilson's, 1975).

Se han empleado una gran variedad de medios de cultivo para el aislamiento de EGB, desde medios de cultivo básicos debido a sus pocos requerimientos nutritivos, pasando por medios selectivos para reducir al mínimo la proliferación de especies no deseadas a partir de muestras clínicas, hasta medios selectivos y a la vez diferenciales que al mismo tiempo que inhiben el crecimiento de microorganismos acompañantes, permiten una identificación presuntiva del microorganismo (de la Rosa et al., 1983).

El empleo de medios selectivos, lleva a una mayor tasa de recuperación de EGB y su empleo es necesario, sobre todo en estudios epidemiológicos (Baker et al., 1973b; Mason et al., 1976; Gray et al., 1979; Persson and Forsgren, 1987).

Baker y col. en 1973, propusieron utilizar un Todd-Hewitt adicionado de 8 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina y 15 $\mu\text{g/ml}$ de ácido nalidíxico como sustancias selectivas (conocido como SBM) (Baker et al., 1973b). Posteriormente, se han empleado concentraciones menores de gentamicina (Easmon et al., 1983a) ya que las comparaciones realizadas en el laboratorio y el uso práctico, revelan que la gentamicina a estas concentraciones inhibe el crecimiento de algunas cepas de EGB (Gray et al., 1979; Santos and Hill, 1984).

Colistina y ácido nalidíxico (Fenton et al, 1979), polimixina, ácido nalidíxico y cristal violeta (Gray et al., 1979), Trimetoprim - Sulfametoxazol (SxT) (Gunn et al., 1977) son algunas otras de las combinaciones utilizadas en medios selectivos.

Muchas otras combinaciones antibióticas se han utilizado para inhibir el crecimiento de microorganismos que se encuentran en muestras clínicas sobre todo bacilos gram negativos y estafilococos encontrados frecuentemente en embarazadas y recién nacidos; no obstante, aunque estos medios facilitan el diagnóstico de EGB, no lo aceleran ya que la identificación del microorganismo ha de hacerse con posterioridad.

Con propósitos de selección pero también de identificación presuntiva de EGB, lo que lleva a un diagnóstico mucho más rápido, se han desarrollado otros medios de cultivo basados en la producción de un pigmento anaranjado carotenóide característico de *S. agalactiae* (Sección 1.2).

1.1.5. Cepas de origen humano - animal

Desde hace años, se han cuestionado las relaciones entre cepas de origen humano y bovino aunque hasta la fecha no hay evidencia que las vacas sean un reservorio para la transmisión de EGB a humanos (Finch and Martin, 1984; Baker and Edwards, 1990).

La comparación realizada entre los aislamientos humanos y bovinos revela la existencia de un determinante antigénico común de grupo (Santos and Hill, 1984), no obstante, existen diferencias bioquímicas, biológicas y serológicas entre ellos (Hardie, 1986; Jensen, 1985; Lammler et al., 1985) que apoyan que ambos aislamientos, humanos y bovinos constituyan 2 biotipos diferentes; pero, puesto que por el momento no se ha establecido una diferenciación taxonómica entre ellos, ambos patógenos humanos y bovinos se siguen considerando una sola especie (Finch and Martin, 1984; Baker and Edwards, 1990; Jensen, 1985).

Si bien, entre todos los aislamientos de animales los bovinos son los mencionados con mayor frecuencia en la bibliografía, EGB también se ha aislado (ocasionalmente de muestras patológicas) de cerdos, nutrias, peces, perros (Wibawan et al., 1993; Kornblatt et al., 1983; Robinson and Meyer, 1966).

1.1.6. Productos bacterianos

Entre los productos bacterianos elaborados por EGB, podemos incluir además del polisacárido capsular soluble tipo-específico, otros productos como: hemolisina, factor CAMP, pigmento, neuraminidasa, ácido lipoteicoico, hipuricasa, nucleasas, toxinas, hialuronidasa y proteasas (Kjems et al., 1980; Tapsall, 1986; Marchlewicz and Duncan, 1980; Ferrieri, 1985a; Baker and Edwards, 1990). La importancia de estos productos bacterianos y el interés de su estudio radican en la posibilidad de intervenir en la interacción bacteria-huésped, contribuir a la patogénesis de la infección por EGB y/o a la virulencia de la bacteria (Ferrieri, 1985a).

Hasta el momento, se desconoce el papel de cada uno de estos productos bacterianos, aunque diversos estudios apoyan que aquellas cepas que elaboran cantidades elevadas de antígeno capsular tipo-específico independientemente de otros productos elaborados por el microorganismo, muestran mayor virulencia (Ferrieri, 1985a; Durham et al., 1981). Se ha establecido también, una asociación entre neuraminidasa y virulencia (Milligan et al., 1978b).

Otros estudios sugieren que el ácido lipoteicoico juega un papel importante en la adherencia de EGB a células de membranas mucosas y por tanto en la invasividad (Ferrieri, 1985a; Nealon and Mattingly, 1983).

1.1.7. Composición antigénica

Además del antígeno polisacárido específico de grupo, EGB posee antígenos carbohidratos mayores tipo-específicos (Ia, Ib, II, III, IV, V), un antígeno menor específico de tipo (Iabc) y antígenos proteicos (Tabla I) (Edwards and Baker, 1990; Benedí y Hervás, 1992).

Mediante microscopía electrónica, se ha podido observar que los antígenos polisacáridos tipo-específicos se sitúan en la parte más externa de la pared formando una cápsula que normalmente recubre por completo el carbohidrato de grupo mientras que los antígenos proteicos solo han podido demostrarse como estructuras

filamentosas en la superficie externa de la pared atravesando la cápsula (Wagner et al., 1980; Wagner and Wagner, 1985).

Antígeno específico de grupo

Está constituido por ramnosa, N-acetilglucosamina, galactosa, glucitol y fosfato, siendo la ramnosa el componente predominante (70-80% de su composición) (Kasper et al., 1985). Ramnosa también es el azúcar mayoritario en el polisacárido de grupo G, por lo que en ocasiones pueden ocurrir reacciones cruzadas entre ambos grupos (Hardie, 1986; Ross, 1984; Baker and Edwards, 1990).

Diversos estudios apoyan que los anticuerpos desarrollados frente al antígeno de grupo B, no son funcionales en la inmunidad a la infección por EGB (Lancefield et al., 1975; Kasper et al., 1985).

Antígenos tipo-específicos

Actualmente se consideran como antígenos responsables de un serotipo a los polisacáridos capsulares Ia, Ib, II, III, IV y V (Benedí y Hervás, 1992).

La estructura base de todos ellos son unidades repetidas de galactosa, glucosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, variando la proporción molar de estos componentes y la forma de enlace de los monosacáridos anteriormente mencionados en los distintos serotipos (Wessels et al., 1989; Kasper et al., 1985; Wessels et al., 1991; Benedí y Hervás, 1992).

El serotipo históricamente designado como Ic (Wilkinson and Eagon, 1971), se denomina actualmente, tipo Ia/c, ya que estas cepas poseen un antígeno polisacárido capsular inmunológicamente idéntico al de las cepas Ia y el antígeno proteico "c" (Edwards and Baker, 1990; Baker and Edwards, 1990).

Existe un determinante antigénico menor, el polisacárido labc, común a todas las cepas tipo I y al que se debe la reactividad cruzada dentro de este serotipo

(Lancefield et al., 1975; Kasper et al., 1985).

Se ha demostrado que los anticuerpos frente a estos antígenos polisacáridos capsulares confieren protección pasiva en ratones inoculados con cepas homólogas (Lancefield et al., 1975; Hardie, 1986).

Antígenos proteicos

El antígeno proteico Ibc (Wilkinson and Eagon, 1971), se detectó inicialmente solo en cepas de los serotipos Ib y Ic (actualmente Ia/c), de ahí su denominación, pero como posteriormente se ha encontrado como antígeno en los serotipos II, III y IV, se propuso un cambio de nomenclatura denominándose "c" (Jelinková and Motlová, 1985a). Este antígeno proteico se ha subdividido con propósitos epidemiológicos, en los determinantes α y β (tripsina resistente y tripsina sensible, respectivamente) (Bevanger and Maeland, 1979; Johnson and Ferrieri, 1984).

Se ha encontrado producción de anticuerpos protectores frente a este antígeno (Lancefield et al., 1975).

Además de la proteína c, algunas cepas poseen los antígenos proteicos X y R (Christensen and Christensen, 1985a). El antígeno R se ha encontrado también en otros grupos serológicos de estreptococos (A, C, G) (Christensen and Christensen, 1985a) y el antígeno X, se asocia únicamente a cepas de origen bovino (Jensen, 1985).

No se han descrito como funcionalmente importantes, ni se han asociado con virulencia (Kasper et al., 1985) aunque se ha sugerido su utilidad como marcador epidemiológico en la clasificación de cepas no tipables.

En la tabla I, se detallan los serotipos y determinantes antigénicos de los estreptococos del grupo B de origen humano (Baker and Edwards, 1990).

Tabla I. Serotipos y determinantes antigénicos de estreptococos del grupo B

SEROTIPO	ANTIGENOS		
	Polisacáridos		Proteicos
	Mayor	Menor	
Ia	Ia	Iabc	-
Ib/c	Ib	Iabc	c
Ia/c	Ia	Iabc	c
II	II	-	c*
III	III	-	c [†] , R [‡] , X [‡]
IV	IV	-	c, R [‡] , X [‡]

*: 40% de las cepas poseen antígeno proteico c

†: cepas del serotipo III ocasionalmente pueden poseer el antígeno proteico c

‡: significación biológica desconocida

1.1.8. Identificación

Puesto que, *S. agalactiae* está bien definido como estreptococo que posee el antígeno carbohidrato de pared celular de grupo B, la identificación definitiva requiere la detección del antígeno específico de grupo, común a todas las cepas; no obstante, esta especie también está bien definida fisiológica y bioquímicamente por lo que casi siempre es posible una identificación presuntiva en base a ciertas características de crecimiento y tests bioquímicos (Facklam et al., 1974; Facklam and Washington, 1991; Ross, 1984). Estos incluyen, resistencia a bacitracina y trimetoprim-sulfametoxazol (92-98% de cepas resistentes), hidrólisis de hipurato sódico (99% positividad), hidrólisis de bilis en presencia de esculina (reacción negativa en 99% de las cepas), reacción CAMP (98-100% de cepas son CAMP positivas) y producción de un pigmento naranja en condiciones adecuadas (Islam, 1977; Jokipii and Jokipii, 1976; McFaddin, 1980; Waitkins, 1980; Facklam and Washington, 1991).

Para la identificación serológica, se han desarrollado algunos métodos: contra-inmunolectroforesis, precipitación, enzimoimmunoensayo, inmunofluorescencia, (Cropp et al., 1974; Romero and Wilkinson, 1974; Boyer et al., 1981; Wüst et al., 1993), co-aglutinación estafilocócica (Christensen et al., 1973; Edwards and Larson, 1974; Kirkegaard et al., 1977; Finch, 1979) y aglutinación con partículas de látex unidas a antisueros específicos de grupo B (Edwards et al., 1979; Friedman et al., 1984). Los dos últimos son los más empleados debido a su disponibilidad comercial y su fácil y rápida ejecución, lo que conlleva un acortamiento del tiempo de identificación respecto de las pruebas convencionales de extracción y de precipitación en capilares (Facklam and Washington, 1991).

1.1.9. Epidemiología y Transmisión

1.1.9.1. Colonización

Adultos

S. agalactiae coloniza las mucosas de distintas localizaciones, pudiendo encontrarse como parte de la flora normal en el tracto respiratorio superior, tracto gastrointestinal, perineo y tracto genital (Easmon and Hastings, 1985; Ross, 1984).

Durante algún tiempo, se consideró el tracto genital femenino como el principal reservorio de EGB, a partir del cual se produciría la contaminación a otras zonas próximas, sin embargo, Franciosi y col. 1973, Aber y col. 1976, Badri y col. 1977, Dillon y col. 1982, describieron un mayor porcentaje de colonización rectal respecto al vaginal, sugiriendo que era el tracto gastrointestinal el reservorio primario de EGB y que éste tenía un papel importante en la contaminación del tracto genital y por consiguiente en la transmisión al neonato.

El considerar el TGI como lugar primario de colonización explica los siguientes hechos:

- mayor tasa colonización anorectal respecto a la vaginal y mayor persistencia de colonización vaginal cuando los cultivos rectales son positivos (Franciosi et al., 1973; Badri et al., 1977; Dillon et al., 1982; Boyer et al., 1983b).

- colonización vaginal intermitente en mujeres embarazadas (Dillon et al., 1982; Anthony et al., 1978; Badri et al., 1977; Boyer et al., 1983a; Easmon and Hasting, 1985; Yow et al., 1980).

- fallo en la terapéutica con penicilina para erradicar la colonización vaginal, incluso tratando a la pareja simultáneamente (Dillon et al., 1987; Gardner et al., 1979; Easmon, 1986b; Anthony, 1982).

- aislamiento de EGB de duodeno y yeyuno proximal en adultos sanos (Anthony et al., 1983; Edwards and Baker, 1990) y su asociación con infecciones postquirúrgicas del tracto intestinal (Barnham, 1983).

- su importancia como patógeno urinario en mujeres embarazadas (Mead and Harris, 1978; Edwards and Baker, 1990; Wood and Dillon, 1981).

Las tasas de colonización urogenital varían de unos estudios a otros, habiéndose descrito rangos del 4,6% al 40% (Baker, 1977a; Anthony, 1982; Baker, 1980; Anthony and Okada, 1977). Estas variaciones dependen no solo de la diferencia intrínseca de la población estudiada (edad, paridad, estado socioeconómico, localización geográfica) sino también de los medios y técnicas de cultivo empleados, lugar investigado, número de muestras y frecuencia de muestreo (Franciosi et al., 1973; Baker and Barrett, 1973a; Pass et al., 1979; Anthony et al., 1978; Mason et al., 1976; Yow et al., 1980; Anthony et al., 1981; Edwards and Baker, 1990).

El área genital investigada influye de forma importante en la tasa de colonización, habiéndose descrito mayores tasas de colonización en vagina, uretra y área peri-uretral que en muestras cervicales, por lo que parece existir una disminución progresiva de la densidad bacteriana a medida que el lugar muestreado se aleja del área perineal (Badri et al., 1977; de la Rosa et al., 1992b). Por otro lado, hay que considerar que la tasa de colonización es mayor con el uso de dispositivos intrauterinos y en mujeres sexualmente activas (Baker et al., 1977b). Este último

hecho junto con el aislamiento uretral en prácticamente la mitad de los compañeros sexuales de mujeres colonizadas, sugiere que EGB sea uno de los distintos agentes de transmisión sexual (Wallin and Forsgren, 1975; Anthony, 1985).

El embarazo en sí y el momento de muestreo en éste, no parece afectar la prevalencia de colonización genital (Baker 1977a; Dillon et al., 1982; Easmon and Hasting, 1985). Boyer y col. (1983b), encontraron que el valor predictivo de un cultivo vaginal o rectal positivo en el 2º trimestre del embarazo como determinante de colonización en el momento del parto era del 67%, mientras que un cultivo prenatal negativo aporta un valor predictivo negativo del 92%. Estos hallazgos y los de otros estudios longitudinales (Anthony et al., 1978; Yow et al., 1980) destacan las limitaciones de un solo cultivo genital durante el embarazo como predictor del estado de colonización en el parto.

Es posible también, la colonización de vías urinarias tanto en varones como en mujeres, habiéndose descrito la importancia de la bacteriuria asintomática e infecciones del tracto urinario por EGB como complicaciones del embarazo (Easmon and Hasting, 1985; Wood and Dillon, 1981; Mead and Harris, 1978).

La prevalencia de colonización orofaríngea es muy baja en adultos (aproximadamente un 5%) pero puede incrementarse en homosexuales (20%) (Edwards and Baker, 1990; Baker and Barrett, 1973a; Christensen et al., 1978). La colonización faríngea puede ocasionalmente tener importancia como fuente de transmisión nosocomial (Easmon et al., 1983a).

Neonatos

Parece ser que la colonización del lactante ocurre por infección intrauterina ascendente (Desa and Trevenen, 1984) o bien durante el paso a través del canal del parto (Baker, 1977a), siendo esto especialmente cierto para la forma precoz de la enfermedad.

La colonización del recién nacido se produce en una o mas áreas de su superficie corporal, siendo las localizaciones mas frecuentes el canal auditivo externo, fosas nasales, ombligo y recto (Baker and Edwards, 1990). La selección del lugar de cultivo para la detección de colonización igual que en el caso de los adultos influye en las tasas de ésta.

En las primeras 24 horas de vida, es más probable el aislamiento de EGB en cultivos del canal auditivo externo que en los de fosas nasales, faringe, ombligo y ano-recto (Baker and Barrett, 1973a; Aber et al., 1976; Pass et al., 1979; Ferrieri et al., 1976), constituyendo probablemente el aislamiento en estos sitios una medida de contaminación del líquido amniótico. Después de las 48 horas de vida, faringe, ano-recto, ombligo son los lugares mas comunes de colonización por EGB (Pass et al., 1979; Paredes et al., 1976; Anthony et al., 1979) y cultivos positivos indican verdadera colonización y no contaminación materna. Más allá del periodo neonatal, faringe y ano-recto son los focos más frecuentes de colonización estreptocócica continuando así hasta el inicio de la actividad sexual, cuando el tracto gastrointestinal se hace el lugar de colonización más comun en ambos sexos (Anthony and Okada, 1977; Baker, 1980; Baker and Edwards, 1990).

1.1.9.2. Transmisión

La presencia de EGB en el tracto genital materno, constituye en el momento del parto, un riesgo para el desarrollo de infección en el neonato, ya sea infección asintomática como ocurre mayoritariamente o sintomática (Baker and Barrett, 1973a; Aber et al., 1976; Pass et al., 1979; Anthony et al., 1978; Ancona et al., 1980).

La tasa de transmisión vertical en neonatos de madres colonizadas con EGB en el momento del parto es de un 29-72% (media del 50%) (Baker and Barrett, 1973a; Pass et al., 1979).

Los factores que influyen en la colonización del neonato no están bien conocidos aunque parece ser que el factor materno que más influye en la probabilidad de transmisión vertical es la presencia de un elevado inóculo genital en

el momento del parto (Ancona et al., 1980; Anthony et al., 1978; Pass et al., 1979). Los recién nacidos de madres con elevado grado de colonización desarrollan mas frecuentemente enfermedad invasiva de comienzo precoz; de igual modo, aquellos recién nacidos colonizados en diversos lugares de su superficie corporal presentan mayores tasas de enfermedad (Pass et al., 1979; Dillon et al., 1987; Boyer et al., 1983b). Parto prolongado con ruptura de membranas durante mas de 24 horas, fiebre postparto o endometritis, prematuridad, parecen aumentar también la probabilidad de transmisión al recién nacido (Ferrieri et al., 1977; Ancona et al., 1980).

Además de la exposición durante el parto, se han establecido otras fuentes de transmisión de EGB al neonato. La adquisición nosocomial constituye una fuente importante de contagio en recién nacidos de madres con cultivos negativos, habiéndose detectado en unidades de cuidados neonatales con un elevado índice de colonización endógena y cuando las condiciones propician la propagación de unos niños a otros, fundamentalmente a través de las manos del personal de enfermería (Paredes et al., 1977; Aber et al., 1976; Steere et al., 1975; Noya et al., 1987).

Otra fuente potencial para la transmisión horizontal de EGB al neonato es la comunidad aunque ésta ocurre infrecuentemente (Paredes et al., 1977; Easmon and Hastings, 1985; Gardner et al., 1980).

1.1.10. Clinica de las infecciones por EGB

1.1.10.1. Infección neonatal

Se han descrito dos formas de enfermedad neonatal clínica y epidemiológicamente distintas (Edwards and Baker, 1990; Franciosi et al., 1973):

Enfermedad aguda o de comienzo precoz

El desarrollo de los síntomas se presenta en las primeras horas de vida con una edad media en el momento de la presentación clínica de 20 horas (Franciosi et al., 1973); se incluyen en esta forma de infección las iniciadas in útero (Pass et al., 1982; Desa and Trevenen, 1984) y hasta los siete días después del parto (Anthony and Okada, 1977; Baker et al., 1979; Baker, 1980; Ferrieri, 1985b).

La incidencia de enfermedad es de 0,7-3,7 por cada mil nacidos vivos aunque es mayor en recién nacidos con bajo peso al nacer (20 por cada mil nacidos vivos) (Franciosi et al., 1973; Baker and Barrett, 1973a; Pass et al., 1979; Dillon et al., 1987; Edwards and Baker, 1990).

La tasa de mortalidad se estima en el 40-50% (Anthony and Okada, 1977; Ferrieri, 1985b), siendo mayor en niños inmaduros con síntomas al nacer, aunque recientemente debido a las mejoras en el conocimiento y terapéutica de la enfermedad parece existir una disminución de ésta (Dillon et al., 1987; Baker and Edwards, 1990).

Los factores de riesgo asociados a este tipo de infección son: parto pretérmino con inmadurez y bajo peso al nacer, embarazo gemelar, elevada colonización materna con o sin rotura de membranas, fiebre intraparto o amnionitis y carencia de anticuerpos tipo-específicos (Baker and Barrett, 1973a; Fischer et al., 1983; Ferrieri, 1985b; Franciosi et al., 1973; Pass et al., 1980; Ancona et al., 1980; Anthony et al., 1979).

Los signos y síntomas que se presentan en la infección estreptocócica de comienzo precoz (hipotensión, letargia, apnea, inestabilidad en la temperatura) (Edwards and Baker, 1990; Franciosi et al., 1973; Santos and Hill, 1984; Baker and Edwards, 1990) no son diferenciables de los de cualquier otra etiología, observándose distress respiratorio frecuente e independientemente del foco de infección (Franciosi et al., 1973; Baker and Barrett, 1973a).

Las tres principales formas de expresión clínica de este tipo de enfermedad observadas con aproximadamente igual frecuencia son bacteriemia sin foco identificable de infección, neumonía y meningitis (Baker and Barrett, 1973a;

Edwards and Baker, 1990). La osteomielitis es probablemente tambien una enfermedad de inicio precoz pero no se manifiesta hasta una edad mas avanzada.

Los serotipos responsables de la infeccion se distribuyen por igual entre el I, II y III, pero ante la presentacion de meningitis el serotipo predominante es el III (80% de los casos) (Baker and Barrett, 1973a; Wilkinson et al., 1973; Wilkinson, 1978).

Enfermedad de comienzo tardío

Puede ocurrir ocasionalmente en prematuros pero principalmente afecta a niños nacidos a término entre 7 días y 3 meses de edad con una media de edad al comienzo de los síntomas de 24 días (Baker, 1979; Ferrieri, 1985b).

Entre los antecedentes maternos no suelen encontrarse complicaciones obstétricas y habitualmente se trata de mujeres no colonizadas por EGB (Ferrieri, 1985b).

La mortalidad es significativamente menor que en la enfermedad de comienzo precoz (10-15%) (Baker and Edwards, 1990; Ferrieri, 1985b) aunque entre un 25-50% de los niños con meningitis de comienzo tardío presentan secuelas neurológicas tras la recuperación (Baker, 1977a; Baker and Barrett, 1973a; Baker, 1979; Barton et al., 1973). La tasa de ataque es de 0,5-1,8 por cada mil nacidos vivos (Anthony and Okada, 1977; Baker, 1977a; Dillon et al., 1987).

La meningitis purulenta con o sin bacteriemia detectable es la manifestación clínica descrita con mayor frecuencia tras el periodo neonatal inmediato (Baker and Barrett, 1973a; Edwards and Baker, 1990). A medida que aumenta la edad y la madurez del lactante, la infección causada por estreptococos del grupo B, tiende a manifestarse como un cuadro localizado en órganos diana determinados, tales como el sistema nervioso central, los huesos o las articulaciones; bacteriemia sin foco aparente de infección, e infecciones de hueso y articulaciones son otras formas clínicas de la enfermedad estreptocócica que pueden ocurrir con relativa frecuencia (Howard and McCracken, 1974; Baker, 1979; Edwards and Baker, 1990).

Independientemente del foco de infección, cepas del serotipo III se aislan aproximadamente en el 93% de los pacientes (Wilkinson et al., 1973; Baker et al., 1973c; Ferrieri, 1985b).

Entre las demás formas de enfermedad por estreptococos del grupo B en lactantes se incluyen las siguientes: conjuntivitis, onfalitis, celulitis, sinusitis, otitis media, infección del tracto urinario, osteomielitis, peritonitis, etmoiditis, impétigo, empiema pleural, pericarditis y endocarditis (Baker and Barrett, 1974; Howard and McCracken, 1974; Ammari et al., 1992; Feder and Pae, 1992; Moral et al., 1992).

1.1.10.2. Infección en adultos

Infecciones obstétricas

Las manifestaciones clínicas son variadas, aunque las más comunes son bacteriemia postparto o postaborto, endometritis, corioamnionitis, infecciones de heridas generalmente asociadas a cesáreas e infecciones del tracto urinario (Baker, 1980).

Los estudios microbiológicos revelan que aproximadamente el 20% de los casos de endometritis postparto y entre el 10 y el 20% de los casos de sepsis puerperal son causados por EGB. La mayoría de las mujeres con endometritis desarrollan signos de infección dentro de las primeras 48 horas tras el parto, habiéndose encontrado una fuerte asociación entre parto abdominal y endometritis (Faro, 1981; Gibbs and Blanco, 1981; Pass et al., 1982). La incidencia de secuelas tales como absceso pélvico, shock séptico o tromboflebitis séptica es menor del 2% (Duff, 1986).

Durante el embarazo la frecuencia de las infecciones del tracto urinario por EGB parece ser más alta, y se han asociado a mayor incidencia de parto prematuro, rotura prematura de membranas y aborto (Moller et al., 1984; Wood and Dillon, 1981).

Infecciones no relacionadas con el embarazo

Adultos con estado inmune alterado debido a diabetes mellitus, disfunción hepática crónica, infección por virus VIH, insuficiencia renal crónica, administración de esteroides, esplenectomía funcional o quirúrgica e individuos inmunocomprometidos en general, también son susceptibles a la infección estreptocócica (Edwards and Baker, 1990; Bayer et al., 1976; Verghese et al., 1986; Lerner et al., 1977; Polsky et al., 1986).

Todos los serotipos se han descrito como causantes de infecciones en adultos inmunocomprometidos, aunque cepas del serotipo II son las aisladas con mayor frecuencia en adultos con meningitis (Lerner et al., 1977; Wilkinson, 1978).

Bacteriemia, neumonía, empiema, endocarditis, artritis, osteomielitis, infecciones de la piel y tejidos blandos (celulitis sobre todo en pacientes con diabetes y vasculopatía periférica, abscesos e infecciones de úlceras de decúbito), peritonitis, endoftalmitis, faringitis, meningitis, conjuntivitis e infecciones de vías urinarias en ambos sexos (más frecuentes en individuos con anomalías de vías urinarias) son algunas de las formas clínicas de infección por EGB en adultos (Edwards and Baker, 1990; Verghese et al., 1986; Bayer et al., 1976; Lerner et al., 1977; Laster and Michels, 1984; Mead and Harris, 1978; Cueto, 1989).

1.1.11. Tratamiento

Penicilina G es el antibiótico de elección para el tratamiento de las infecciones por *Streptococcus agalactiae*, no obstante, a pesar de la uniforme susceptibilidad de este microorganismo a penicilina (Anthony and Concepcion, 1975; Baker et al., 1976a; Persson and Forsgren 1986; Berkowitz et al., 1980), la respuesta clínica en algunos casos no es satisfactoria habiéndose descrito recaídas tras una terapia inicialmente adecuada (Dorand and Adams, 1976; Walter et al., 1976).

Las razones para estos fracasos terapéuticos no están claras pero se proponen varias explicaciones para ello:

- concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) a penicilina G relativamente elevadas con respecto a los niveles alcanzables por este antimicrobiano en LCR (McCracken and Feldman, 1976; Baker et al., 1981).

- influencia del inóculo bacteriano en las determinaciones de CMI. Las determinaciones de susceptibilidad "in vitro" normalmente se realizan con un inóculo definido de aproximadamente 10^5 ufc/ml, sin embargo este inóculo puede diferir de la densidad bacteriana alcanzada en infecciones humanas (Feldman, 1976). Se ha demostrado que la susceptibilidad a penicilina y a otros antibióticos disminuye marcadamente en presencia de inóculos elevados, por lo que pueden requerirse dosis mayores para proveer actividad bactericida in vivo (Brood, 1989; McGeary et al., 1983; Carazo, 1991).

- pérdida del carácter bactericida de antibióticos β -lactámicos en condiciones de escasa multiplicación bacteriana como ocurre en presencia de elevados inóculos bacterianos (Tuomanen, 1986).

- tolerancia a penicilina. Se han descrito un 4-6% de cepas tolerantes (Siegel et al., 1981; Kim and Anthony, 1981; Steinbrecher, 1981).

Estos hechos pueden así mismo justificar, las elevadas dosis de penicilina recomendadas para el tratamiento de las infecciones por EGB (Tabla II) y el empleo de combinaciones antibióticas.

EGB también es susceptible in vitro a otros β -lactámicos: ampicilina, cefalosporinas de 1^a y 2^a generación con excepción de cefoxitina considerablemente menos activa (Kim, 1985) y cefalosporinas de 3^a generación (excepto moxalactam) que en virtud de su amplio espectro de acción ofrecen una ventaja teórica como antibióticos únicos en el tratamiento de las infecciones bacterianas serias (Bayer et al., 1982). Imipenem también presenta muy buena actividad in vitro e in vivo (Kim, 1985; Persson and Forsgren, 1986).

Ciprofloxacina presenta una actividad moderada in vitro, pero aún no se ha evaluado su eficacia (Rolston, 1986).

Otros antimicrobianos utilizados en el tratamiento de infecciones por microorganismos gram positivos, como eritromicina, clindamicina, lincomicina, rifampicina, tienen una excelente actividad *in vitro* y una frecuencia de resistencias muy baja (Berkowitz et al., 1990) pero existen pocas experiencias *in vivo* realizadas con antibióticos diferentes a penicilina y ampicilina y la extrapolación de resultados *in vitro* a la práctica clínica podría llevar a fracasos terapéuticos (Kim, 1985).

Aún cuando EGB es resistente a aminoglucósidos *in vitro* (Baker et al., 1976a; Kim, 1985; Persson and Forsgren, 1986), la introducción de éstos en la pauta de penicilina o ampicilina para el tratamiento de la sepsis y la meningitis neonatal se basa en la sinergia demostrada entre estos antibióticos tanto "in vivo" como "in vitro" así como en la necesidad de una cobertura antimicrobiana hasta que el diagnóstico esté establecido (Schauf et al., 1976; Deveikis et al., 1977; Cooper et al., 1979; Swingle et al., 1985).

La combinación de cloranfenicol o rifampicina junto a penicilina o ampicilina, está contraindicada ya que "in vitro", debido a su efecto bacteriostático inhiben la actividad bactericida de penicilina (Weeks et al., 1981; Smith et al., 1982).

La duración del tratamiento y dosificación es arbitraria debiendo modificarse según la edad, gravedad, localización, carácter de la infección y respuesta clínica (Ferrieri, 1985b); no obstante, se recomienda terapia parenteral de 10 días de duración en el tratamiento de neumonía, bacteriemia, pielonefritis e infecciones de tejidos blandos, mientras que se recomienda una duración mínima de 14 días para el tratamiento de meningitis y de un mínimo de 4 semanas en el caso de endocarditis o ventriculitis (Edwards and Baker, 1990; Haft and Kasper, 1992).

Las pautas antimicrobianas recomendadas para el tratamiento de infecciones por EGB, se muestran en la tabla II (Edwards and Baker, 1990).

Tabla II. Tratamiento de infecciones por estreptococos del grupo B.

Diagnóstico	Neonatos	Adultos	*Alergia a Penicilina	Duración
Bacteriemia e infecciones de tejidos blandos	- ampicilina (150-200 mg/kg/día) + aminoglucósido inicialmente - penicilina G (200.000 U/Kg/día)	- penicilina G (10 millones U/día)	- vancomicina - cefalosporina 1ª generación (6-8 g/día)	10 días; suspender el aminoglucósido cuando los líquidos corporales sean estériles
Meningitis	- ampicilina (300-400 mg/Kg/día) + gentamicina inicialmente - penicilina G (500.000 U/Kg/día)	- penicilina G (20-30 millones U/día)	- cloranfenicol - vancomicina	14 días (mínimo) Suspender el aminoglucósido cuando el LCR sea estéril
Otitis media	- penicilina G (200.000 U/Kg/día)	- penicilina G (10-20 millones U/día)	- vancomicina	3-4 semanas
Endocarditis	- penicilina G (400.000 U/Kg/día)	- penicilina G (20-30 millones U/día) con o sin aminoglucósido	- vancomicina con o sin aminoglucósido	4 semanas

* En adultos alérgicos a la penicilina, se puede administrar una cefalosporina como cefalotina o en caso de anafilaxia previa vancomicina (Haft and Kasper, 1992).

1.1.12. Profilaxis

Se han sugerido dos enfoques básicos, quimioprofilaxis e inmunoprofilaxis, como medio para lograr la prevención de infecciones por estreptococos del grupo B.

Quimioprofilaxis

La quimioprofilaxis teóricamente podría dirigirse a las mujeres durante el embarazo (quimioprofilaxis prenatal), las parturientas en el momento del parto (quimioprofilaxis intraparto) o a los neonatos al nacimiento (quimioprofilaxis postnatal).

La prevención de la enfermedad neonatal por eliminación de la colonización materna durante el embarazo no ha sido exitosa, puesto que aunque parece existir una eliminación temporal del microorganismo durante el tratamiento, al suprimir éste hay un retorno al estado portador (Badri et al., 1977; Morales et al., 1986; Yow et al., 1979; Gardner et al., 1979); sí se ha demostrado una reducción significativa de la colonización materna y neonatal con el tratamiento continuado de mujeres colonizadas en el último trimestre o a partir de la 38 semana de gestación hasta el parto (Lewin and Amstel, 1981; Boyer and Gotoff, 1985), aunque este régimen puede no ser beneficioso para niños de menor edad gestacional.

La mayoría de los estudios (Boyer et al., 1983c, Morales et al., 1985; Yow et al., 1979; Easmon et al., 1983b; Lim et al., 1986) sugieren que la administración intravenosa de ampicilina durante el parto es claramente un método efectivo para prevenir la transmisión intraparto de EGB de madres a hijos.

Los mecanismos por los que este tratamiento previene la transmisión intraparto de EGB pueden ser una supresión temporal de la colonización vaginal y rectal, una elevada concentración de ampicilina en líquido amniótico y paso transplacentario de antibiótico al niño (Yow et al., 1979). La dificultad para poner en práctica esta forma de prevención, incluye el problema de identificar correctamente las mujeres portadoras, la necesidad de tratar a gran número de mujeres para prevenir una sola enfermedad neonatal, las potenciales reacciones adversas al antibiótico y la creación de resistencias (Edwards and Baker, 1990).

La profilaxis con penicilina en el recién nacido (quimioprofilaxis postnatal) es de valor limitado (Pyati et al., 1983), ya que hasta el 50% de los neonatos infectados son sintomáticos al nacer (Baker, 1986), de modo que, podría prevenirse la infección precoz transmitida por el paso a través del canal del parto colonizado, pero no las infecciones adquiridas in útero (Boyer and Gotoff, 1985).

Profilaxis antiséptica

El tratamiento local con clorhexidina para suprimir la transmisión de EGB de madres a neonatos, presenta resultados diferentes según los estudios (Christensen and Christensen, 1985b), requiriéndose posteriores investigaciones en este campo.

Inmunoprofilaxis

Puesto que, el riesgo para el desarrollo de enfermedad invasiva por EGB se correlaciona significativamente con la presencia de bajos niveles de anticuerpos maternos a los antígenos tipo-específicos, se ha propuesto la inmunoprofilaxis como medida de prevención de la enfermedad neonatal (Edwards and Baker, 1990; Baker and Kasper, 1976b; Baker et al., 1988).

Se han desarrollado vacunas con antígenos polisacáridos purificados de EGB, que han resultado inmunógenas y bien toleradas en voluntarios (Baker et al., 1988); la inmunización de adultos con niveles moderados de anticuerpos tipo-específicos, muestra una tasa de respuesta que se aproxima al 100%, de modo que, la inmunización activa en mujeres durante el último trimestre del embarazo, mediante la administración de una vacuna con antígeno capsular polivalente, teóricamente podría proveer niveles de anticuerpos suficientes para prevenir de forma pasiva el desarrollo de enfermedad sistémica en el recién nacido. No obstante, hasta un 40% de los adultos no inmunes fallan para ofrecer una respuesta inmune satisfactoria frente a los distintos antígenos polisacáridos de EGB; esta respuesta a la inmunización parece estar genéticamente determinada (Grubb et al., 1982).

Puesto que, los neonatos prematuros serían excluidos de la protección que pudiera aportar la inmunización materna, ya que los niveles de inmunoglobulina G adquirida transplacentariamente por el feto incrementan proporcionalmente durante el último trimestre del embarazo, se ha sugerido la inmunización pasiva del recién nacido para prevenir o incluso aminorar la infección en el caso de que ya se encuentre establecida (Fischer et al., 1986; Noya et al., 1988).

1.2. REVISION DEL PIGMENTO PRODUCIDO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*.

1.2.1. Antecedentes y estado actual

En 1919, Orla Jensen describió la existencia de estreptococos pigmentados, al observar que varias cepas de estreptococos patógenos producían una coloración roja en agar peptona caseína y que *Streptococcus mastitidis* (actualmente *S. agalactiae*) producía un color naranja en caldo peptona caseína cuando se añadía almidón soluble (Fallon, 1974). El aislamiento de una cepa de estreptococo pigmentada de un caso de pielonefritis, fue descrito por Olivieri en 1929.

En 1934, Lancefield describió una cepa de estreptococo del grupo B que formaba un pigmento amarillento. Plummer en 1941, en un estudio de 522 cultivos de estreptococos hemolíticos encontró que 128 de las 187 cepas de EGB estudiadas producían pigmento aunque también describió formación de pigmento en una cepa de estreptococo del grupo D y otra no agrupable (Fallon, 1974).

Tras la breve mención de Esseveld, Daniëls-Bosman y Leijinse en 1958, no existen mas referencias de la pigmentación de EGB hasta 1974, año a partir del cual el fenómeno de la formación de pigmento en *S. agalactiae*, ha adquirido una enorme importancia, principalmente porque esta característica puede utilizarse para la identificación de este grupo de estreptococos (Fallon, 1974; Flandrois et Fleurette, 1975; Merritt and Jacobs, 1976a; Merritt et al., 1976b; Islam, 1977; Johns et al., 1980; de la Rosa et al., 1983; Noble et al., 1983; Tapsall and Phillips, 1987b).

Entre los aislamientos clínicos de estreptococos, solamente *S. agalactiae* es capaz de formar pigmento anaranjado durante el crecimiento en medios de laboratorio (Fallon, 1974; Merritt and Jacobs, 1978; Noble et al., 1983), aunque se ha detectado un pigmento amarillento formado por una cepa de *Enterococcus faecium* aislada a partir del suelo (Taylor and Davies, 1974) y en otra cepa procedente de un aislamiento clínico con características bioquímicas compatibles con *E. casseliflavus* (Pompei et al., 1991).

Salvo estas referencias, no se ha descrito formación de pigmento en otros estreptococos por lo que se puede considerar una característica específica de *S. agalactiae* y por ello puede utilizarse como prueba para la identificación presuntiva de este microorganismo y como tal fue descrita por Fallon en 1974, usando como medio de cultivo Agar Columbia o Agar Columbia + 5% sangre aunque se demostró que la adición de esta última no era necesaria para la visualización del pigmento (Fallon, 1974). En este medio y en condiciones de incubación anaerobias Fallon, detectó un 85% de cepas productoras de pigmento aunque un estudio posterior realizado en 1976 por Merritt y col., describió que el uso de Agar Columbia en tubos, en condiciones de incubación aerobia, era capaz de detectar pigmento en un 97% de las cepas (Merritt et al., 1976b).

En 1977, Islam, mientras examinaba las características culturales de la flora genitourinaria en agar almidón/suero (medio diferencial para aislamiento de *Gardnerella vaginalis*), observó que la mayoría de los EGB producían colonias naranjas sobre este medio y que el pigmento era más intenso y más fácilmente detectable que en Agar Columbia. Profundizando en este estudio, desarrolló un medio en el que se mejora notablemente la producción de pigmento y que ha sido la base de muchos medios de cultivo basados en la detección de pigmento descritos posteriormente (Islam, 1977).

La formulación del medio descrito por Islam es la siguiente:

Proteosa Peptona N°3 (Difco)	2'3%
Almidón soluble	5%
Agar N°1 (Oxoid)	1%
Suero de caballo	5%
Na ₂ PO ₄ H	0'04 M
NaPO ₄ H ₂	0'012 M

pH final = 7'4

Debido a que, el aislamiento de estreptococos β -hemolíticos en la práctica de rutina de un laboratorio clínico puede estar complicado por el sobrecrecimiento de flora comensal asociada a la muestra, Waitkins en 1982, propuso la utilización del medio descrito por Islam modificándolo con la adición de antibióticos con la finalidad de hacer un medio selectivo que inhibiera el crecimiento de la mayor parte de la flora normal permitiendo un buen desarrollo de EGB.

Los antibióticos empleados para hacer selectivo este medio fueron: neomicina, ácido nalidíxico y metronidazol a una concentración final de 30 mg/l, 15 mg/l y 50 mg/l respectivamente. El empleo de gentamicina como agente selectivo en el medio, aunque inicialmente propuesto no fue útil puesto que a la concentración necesaria para su empleo como inhibidor, impidió el crecimiento de algunas cepas de EGB y disminuyó la producción de pigmento en otras (Waitkins, 1982).

Muchas son las variaciones que se han realizado sobre el medio descrito por Islam, entre las que cabe destacar las propuestas por Noble y col. en 1983: reducción de la concentración de suero o eliminación de éste, sustitución del suero de caballo inactivado por suero no inactivado, reducción de la concentración de almidón o eliminación de éste, eliminación completa o parcial del buffer ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, NaH_2PO_4) y eliminación del agar. Todos estos cambios han ayudado a determinar la importancia de la composición del medio de cultivo en la pigmentación de EGB (Noble et al., 1983).

En 1983, De la Rosa y col., basándose así mismo en la formulación del medio descrito por Islam (Islam, 1977) diseñaron un medio de cultivo selectivo y a la vez diferencial (medio Granada) en el cual EGB exhibe su característico pigmento anaranjado permitiendo la detección precoz de este microorganismo aún de muestras muy contaminadas con flora normal del organismo.

El medio contiene: 3'8% Proteosa Peptona N°3 (Difco), 15% Almidón soluble, 0'3% ClNa, 10% Suero de caballo coagulado, 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Trimetoprim (lactato) y buffer fosfato 0'06M suficiente para un pH final del medio de 7,4. Con esta nueva formulación, se observó que las colonias de EGB eran más pigmentadas

y fáciles de diferenciar que en el medio Islam (medio de color amarillento) y que el incremento en las concentraciones de almidón y suero, llevaba a un aumento en la pigmentación (de la Rosa et al., 1983). No obstante, la modificación y hallazgo más importante de la formulación del medio Granada, es la incorporación de trimetoprim, un inhibidor del metabolismo del ácido fólico que en condiciones de incubación anaerobias lleva a un aumento en la formación de pigmento por este microorganismo (de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1990b).

En 1984, Reardon y col. describieron la eficacia de un método colorimétrico para la detección de pigmento utilizando un caldo enriquecido en almidón y suero, altamente selectivo y diferencial para EGB (Reardon et al., 1984).

En 1987, Richardson y col. propusieron utilizar como medio de cultivo una modificación descrita por Noble y col. en 1983, al incrementar el contenido en almidón y suero (ambos al 10%) con la finalidad de permitir una detección más precoz de EGB (Richardson et al., 1987; Wang et al., 1988). El empleo de escobillones con la muestra inoculados directamente en este medio semi-sólido selectivo-diferencial combina una fácil y rápida detección del pigmento, ya que al ser formado éste por bacterias en replicación se observa un cambio de color alrededor del escobillón introducido en el medio y una disminución del tiempo necesario para su visualización al actuar no solo como medio de cultivo sino también como medio de transporte de la muestra (Wang et al., 1988). No obstante, este medio presenta muy baja sensibilidad y la interpretación de los resultados ha de hacerse con precaución por la posibilidad de falsos positivos debidos a muestras sanguinolentas (Wang and Richardson, 1990).

Recientemente, De la Rosa y col. (1992), han diseñado un nuevo medio (NGM) que también puede utilizarse como transporte de muestras clínicas en el que el pigmento puede observarse tras 8-12 horas de incubación del escobillón con la muestra en el medio de cultivo, en condiciones de incubación aerobias, lo que permite identificar más rápidamente aquellas mujeres candidatas a profilaxis intraparto o neonatos que pueden desarrollar infección por este microorganismo y en

el que se favorece la visualización de pigmento incluso en cepas poco pigmentadas al incluir en la formulación un inhibidor del metabolismo del ácido fólico, lo que conlleva un considerable incremento en la sensibilidad (de la Rosa et al., 1990b; de la Rosa et al., 1992a).

La formulación de este medio es la que sigue:

Proteosa Peptona N° 3 (Difco)	2'5%
Almidón soluble (Merck 1252)	2%
Glucosa	0'25%
Sulfato de Magnesio	0'02%
Na ₂ PO ₄ H	0'06M
MOPS (sal hemisódica)	0'05M
Piruvato sódico	0'1%
Methotrexato	6 µg/ml
Suero de caballo	5%
pH final = 7,4	

Para hacer el medio selectivo se adiciona:

Metronidazol	10 µg/ml
Cristal violeta	0'2 µg/ml
Colistina	5 µg/ml

La comparación realizada entre el medio propuesto por Islam (Islam, 1977), medio suero /almidón de Richardson (Richardson et al., 1987; Wang et al., 1988) y NGM (de la Rosa, 1992a), utilizando como referencia un Todd-Hewitt selectivo y subcultivo, mostró una mayor sensibilidad para NGM con respecto a los anteriores; del mismo modo, el empleo de medio NGM semi-sólido en tubo en el que se inocula directamente un escobillón con la muestra en condiciones de incubación aerobias con respecto al NGM utilizado en placas incubadas anaerobicamente provee sensibilidades del 100% y 97% respectivamente. Los medios de Islam y Richardson tuvieron sensibilidades del 68% y 66% respectivamente, al comparar con el empleado de referencia (de la Rosa et al., 1992a).

1.2.2. Naturaleza y espectro de absorción

No se ha podido determinar aún la naturaleza del pigmento, debido a que se encuentra asociado a la membrana celular y es extraído con los componentes de ésta o bien porque permanece unido formando un complejo con el almidón empleado en medios de cultivo para favorecer su formación (Merritt and Jacobs, 1978; Tapsall, 1987a) o al almidón incorporado a las soluciones empleadas para su extracción. Debido a estas limitaciones, solamente se ha caracterizado por su espectro de absorción UV-visible, el cual presenta múltiples picos en la región entre 400-550 nm, lo que ha sugerido una naturaleza carotenoide (Merritt and Jacobs, 1978; Tapsall, 1987a).

El pigmento no es extraíble de células intactas con éter, metanol, etanol, acetona, éter de petróleo, KOH alcohólica o mezclas éter/acetona (Merritt and Jacobs, 1978).

Por medidas de absorbancia, Tapsall (Tapsall, 1987a) observó que EGB produce pigmento durante todas las fases de crecimiento, aunque las células en fase exponencial tardía y fase estacionaria temprana parecen producir mayor cantidad de pigmento que las que se encuentran en una fase exponencial temprana.

Las características espectrales cambian durante el crecimiento ya que células en fases tempranas producen un pigmento rosado con una mayor absorción a 520 nm así como con la asociación del pigmento a una molécula portadora como puede ser el almidón (Tapsall, 1987a).

Análisis espectrofotométricos revelan la existencia de 2 tipos de pigmento:

- Un pigmento con 4 picos de absorción (435 nm, 455 nm, 485 nm y 520 nm) descrito inicialmente por Merritt and Jacobs (1978), en extractos obtenidos mediante el tratamiento con fenol/glicerol del sedimento de caldos de cultivo y en el sobrenadante de células sonicadas sometidas a centrifugación diferencial. La forma de estos picos en la curva de absorción muestra semejanzas a la exhibida por varios carotenoides (Merritt and Jacobs, 1978; Tapsall, 1986).

- Un pigmento con una sola banda de absorción en el visible (420 nm) fue descrito por Haug and Soderlung (1977). Este pico de absorción varía según la intensidad de color observada en los cultivos, no encontrándose en cepas no pigmentadas.

En 1986, Tapsall observó y relacionó ambos tipos de pigmento con la presencia o ausencia de almidón; de tal modo que, en presencia de almidón bien incorporado al medio de cultivo o en la solución utilizada para extraer el pigmento, se detecta pigmento de 4 picos mientras que solamente aparece una banda de absorción a 415 nm cuando éste se encuentra ausente. Parece ser que, el almidón actúa como molécula portadora o estabilizadora del pigmento favoreciendo su liberación al medio y formando un complejo con éste, por lo que en su ausencia el pigmento quedaría asociado a la célula, no haciéndose visualizable.

La ruptura del complejo almidón-pigmento por tratamiento con amilasa o por calentamiento a ebullición lleva a una degradación rápida e irreversible del pigmento de 4 picos a la forma de una sola banda de absorción a 415 nm.

A menos que se empleen métodos espectrofotométricos, pequeñas cantidades de pigmento con un solo pico de absorción son difíciles de observar, especialmente en medios con coloración similar (Tapsall, 1986).

Se desconoce la función que desempeña el pigmento en EGB, pero se ha sugerido un papel en la protección de la bacteria frente a la letalidad de los superóxidos (Nemergut and Merritt, 1982) así como en la patogénesis de la infección por este microorganismo (Wennerstrom et al., 1985).

1.2.3. Condiciones y características de aparición del pigmento

1.2.3.1. Influencia de la composición del medio de cultivo

Prácticamente todos los medios mencionados anteriormente para detección e

identificación de EGB mediante producción de pigmento son bastantes semejantes en su composición, incorporando peptonas, almidón, un tampón y suero; no obstante, se ha descrito que algunos de estos componentes pueden afectar de forma importante la formación y visualización del pigmento producido por este microorganismo (Fallon, 1974; de la Rosa et al., 1983; Noble et al., 1983). Entre ellos cabe destacar:

ALMIDON

Inicialmente la formación de pigmento en cepas de *S. agalactiae*, se describió únicamente en condiciones de incubación anaerobia y en presencia de almidón, no obstante se ha demostrado que si bien estas condiciones son beneficiosas no son esenciales en su formación (Fallon, 1974; Merritt and Jacobs, 1976a; Haug and Soderlung, 1977).

Es posible la producción de pigmento en medios que no incorporan almidón (Merritt and Jacobs, 1976a) aunque con una menor intensidad o tras un periodo prolongado de incubación, por lo que su requerimiento en medios de cultivo para formación del pigmento es más relativo que absoluto (Fallon, 1974).

En la elaboración de medios de cultivo, se han empleado concentraciones de almidón que van desde el 0,1% hasta el 15% (Fallon, 1974; Merritt and Jacobs, 1978; de la Rosa et al., 1983; Reardon et al., 1984; Islam, 1977; de la Rosa et al., 1992a); si bien, se ha descrito que, el empleo de almidón a concentraciones superiores del 5% interfiere con la formación de gel de agar originando precipitados difíciles de dispersar, los estudios de De la Rosa y col. (1983) demostraron que este hecho puede evitarse agitando continuamente el medio cuando se calienta y que medios que contienen más del 10% de almidón toman color blanco solidificando sin necesidad de adicionar agar. No obstante, el empleo de almidón a concentraciones del 1-2% parece proveer los mejores resultados (de la Rosa et al., 1992a).

El tipo, concentración, grado de hidrólisis y contenido en ácidos grasos residuales de los almidones puede influir en su actuación como activador o molécula estabilizadora del pigmento (de la Rosa et al., 1983).

Es posible que la incorporación de almidón posea 2 efectos diferentes: un efecto promotor del crecimiento (nutriente) y un efecto activador del pigmento (de la Rosa et al., 1990a).

GLUCOSA

El efecto de la incorporación de glucosa a medios de cultivo para producción de pigmento depende de la concentración de ésta, ya que se han descrito hechos contradictorios a este respecto (Merritt and Jacobs, 1978).

Schaufuß y col. (1985), describieron que el empleo de concentraciones de glucosa de 0,4 g/l incrementa la formación de pigmento en la mayoría de los grupos B humanos mientras que glucosa a 4 g/l disminuye o casi suprime la pigmentación (Schaufuß et al., 1985). Propiedades similares inhibitorias de la glucosa fueron observados anteriormente (Merritt and Jacobs, 1978), al relatar que la adición de glucosa al agar sangre a concentraciones relativamente bajas (0,04%) significativamente aumentaba el metabolismo estreptocócico y reactividad CAMP y que elevadas concentraciones de glucosa (0,64%) totalmente inhiben el desarrollo de esta reacción.

En 1989, Griffiths confirmó la influencia de la concentración de glucosa sobre el crecimiento de EGB, observando así mismo que la producción de hemolisina está igualmente influenciada por la cantidad de glucosa en el medio de cultivo (Griffiths, 1989).

Por todo ello, no solo es importante el empleo de concentraciones adecuadas de glucosa en medios de cultivo para detección de pigmento sino también en las soluciones empleadas para su extracción (Tapsall, 1986); soluciones extractoras que contienen un 0,1-1% de glucosa han mostrado mayor rendimiento que soluciones que

contienen un 2%. Parece ser que la explicación de este hecho se debe a que concentraciones elevadas de glucosa producen una disminución del pigmento por caída del pH, lo que se traduce en una disminución de los picos absorción de menores longitudes de onda (Tapsall, 1987a).

El requerimiento de glucosa en la formación y liberación del pigmento y la inhibición de la formación de éste por adición de iodoacetato sódico (inhibidor metabólico), sugiere que este fenómeno es un proceso metabólico activo y que la glucosa actúa como fuente energética (Tapsall, 1986).

HIDROLIZADOS PROTEICOS

Proteosa peptona N°3 (Difco) es el hidrolizado proteico más frecuentemente utilizado en el diseño de medios de cultivo para pigmentación de EGB (Islam, 1977; de la Rosa et al., 1983). Su eliminación de medios de cultivo no permite el crecimiento, por lo que su función nutritiva, es obvia; no obstante, se han empleado otros hidrolizados proteicos que si bien, son capaces de apoyar el crecimiento a veces no favorecen la formación de pigmento por este microorganismo (de la Rosa et al., 1983).

Las concentraciones incorporadas a los diferentes medios anteriormente mencionados varían aunque son muy semejantes, 2'3% (Islam, 1977), 3'8% (de la Rosa et al., 1983) y 2'5% (de la Rosa et al., 1990a).

SUERO

El enriquecimiento de medios de cultivo mediante la adición de suero de caballo, parece mejorar el crecimiento en general de todos los microorganismos, aunque su función exacta no se conoce; sin embargo, en este caso concreto además se comporta como activador de la pigmentación (Sukroongreung, 1984; de la Rosa

et al., 1983).

Concentraciones de hasta el 10% se han empleado en la elaboración de medios de cultivo, no obstante menores cantidades satisfacen la finalidad de su incorporación (Noble et al., 1983; Reardon et al, 1984; de la Rosa et al., 1992a).

INHIBIDORES DE LA VIA DEL ACIDO FOLICO

De la Rosa y col. en 1983 (de la Rosa et al., 1983), fueron los primeros en utilizar inhibidores de la vía del ácido fólico (trimetoprim) como activadores de la pigmentación de EGB y experiencias posteriores han confirmado el efecto enhancing de estos componentes (Schaufß et al., 1985; Tapsall, 1987a).

Trimetoprim, metotrexato, sulfadiazina, pirimetamina, producen efecto enhancing (de la Rosa et al., 1990b) aunque sólo los dos primeros se han empleado en la elaboración de medios de cultivo para pigmentación (de la Rosa et al., 1983, de la Rosa et al., 1992a).

La concentración de estos inhibidores en el medio no debe ser elevada, ya que producen además una inhibición del crecimiento (de la Rosa et al., 1983; Schaufß et al., 1985; de la Rosa et al., 1990b); la concentración teórica en el caso de trimetoprim es de 25 µg/ml (se deduce de las CMI's de EGB a este antimicrobiano en medios enriquecidos como el medio Granada, ya que las CMI's de los inhibidores del folato son en estos medios muy diferentes a las encontradas en Mueller-Hinton), no obstante, la concentración óptima para su uso en medios de cultivo selectivos para EGB no debe ser superior a 15 µg/ml, ya que a pesar de que las CMI's sean algo mayores, cuando existen inóculos bajos puede producirse una inhibición del crecimiento a esta concentración.

Parece existir una concentración óptima en la que se produce un aumento proporcional de los 4 picos de absorción del pigmento, detectándose un aumento en los picos de mayor longitud de onda a otras concentraciones diferentes lo que se traduce en la observación de un pigmento de color mas rosado (Tapsall, 1987a).

Inhibidores del ácido fólico de cualquiera de los siguientes grupos pueden emplearse para activar la pigmentación de *Streptococcus agalactiae*: inhibidores de la enzima dihidrofolato reductasa (metotrexato, trimetoxato, diaveridina), inhibidores de la dihidropteroato sintetasa (sulfamidas), inhibidores de la timidilato sintetasa (derivados de la fluorouridina y fluorodesoxiuridina) (Pareja, 1993).

Este efecto activador del pigmento producido por los inhibidores de la vía del folato, puede emplearse para la identificación presuntiva de EGB y como tal se describe en el Manual de Oxoid utilizando el medio propuesto por Islam y discos de 300 o 500 μg de Sulfonamidas (Manual Oxoid, Oxoid Ltd., 1988, Basingtoke, England).

IONES

Soluciones extractoras de pigmento que incorporan 0,001 M de Mg^{2+} , llevan a la formación de un 10% más de pigmento con 4 picos de absorción (Tapsall, 1986) que soluciones carentes de este catión. La incorporación de otros cationes a la misma concentración molar (Ca^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} y Fe^{2+}) no parece afectar a la producción de pigmento, aunque sí se ha descrito que concentraciones de 5-7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Fe son importantes en el crecimiento y formación de hemolisina por EGB (Griffiths, 1989).

La eliminación de fosfatos de medios de cultivo se asocia a pérdida completa de la pigmentación (Noble et al., 1983) e incrementos en la molaridad de buffer fosfato empleado (0,01 M a 0,06 M) se asocia a una mayor formación de pigmento (Tapsall, 1986).

1.2.3.2. Efecto del pH del medio

La formación de pigmento es máxima en el rango de pH 7-7,4, (Tapsall,

1986; de la Rosa et al., 1983) siendo ésta menor a medida que nos alejamos del margen dado.

La influencia del pH confirma las observaciones de Fallon (1974) y apoya los hallazgos precoces de Merritt and Jacobs (1978) del efecto inhibitor de la glucosa en medios de cultivo, ya que ésta promueve una caída rápida del pH hasta rangos en que la disminución del pigmento es significativa (Tapsall, 1986).

1.2.3.3. Efecto de la temperatura y atmósfera de incubación

Aunque clásicamente se ha descrito la producción de pigmento solamente en condiciones de incubación anaerobias (Fallon, 1974), distintas experiencias (Flandrois et Fleurette, 1975; Merritt et al., 1976b; Reardon et al., 1984; Sukroongreung et al., 1984; de la Rosa et al., 1992a) muestran que puede conseguirse en atmósfera aerobia, siempre que el medio de cultivo incorpore los componentes adecuados para ello.

La formación y liberación de pigmento es máxima a 37°C; menores cantidades se forman a 22°C y ningún pigmento se observa a 0°C o a 60°C (Tapsall, 1986).

1.2.4. Relación hemólisis-pigmento

La gran mayoría de las cepas humanas de EGB son productoras de pigmento, habiéndose descrito solamente un 2-3% de cepas carentes de esta propiedad (Henrichsen, 1985; Roe et al., 1976).

Esta capacidad para formar pigmento parece estar relacionada con la liberación de una hemolisina, puesto que cepas no hemolíticas carecen de pigmento (Fallon, 1974; Noble et al., 1983) habiéndose descrito la pérdida simultánea de ambas propiedades como un hecho eventual o bien después de exposición a mutágenos (Wennestrom et al., 1985).

Se han observado semejanzas en la formación de ambos productos "in vitro". La formación y liberación extracelular de hemolisina se realiza por un proceso metabólico activo requiriéndose una molécula portadora para estabilizar la hemolisina liberada (Marchlewicz and Duncan, 1980); el pigmento es formado y liberado bajo condiciones similares (Tapsall, 1986) y también requiere una molécula portadora para completar su liberación y estabilización. La molécula portadora de hemolisina parece ser el ácido lipoteicoico de la pared celular (Tsaihong and Wennerstrom, 1983) aunque una mezcla de almidón - albúmin de suero bovino también se comporta como estabilizador efectivo de la hemolisina de EGB (Griffiths, 1990), no ejerciendo este efecto, estabilizadores de otras hemolisinas (RNA core, suero, albúmina de suero bovino) (Griffiths, 1989).

Recientemente, Wennerstrom y col. han descrito la clonación de genes que codifican producción de pigmento y hemolisina, experiencias que apoyan una estrecha relación entre formación de pigmento y hemolisina, y que los genes determinantes de ambos productos se encuentran íntimamente unidos (Wennerstrom et al., 1991).

1.3. COMPONENTES DE MEDIOS DE CULTIVO QUE INFLUYEN EN LA PRODUCCION DE PIGMENTO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

1.3.1. Almidón

1.3.1.1. Estructura básica

El almidón es un polímero de elevado peso molecular formado por unidades repetidas de D-glucosa que constituye la principal reserva de carbohidratos en plantas.

La mayoría de los almidones son una mezcla de dos tipos de carbohidratos, ambos polímeros de glucosa, denominados amilosa y amilopectina (Schoch, 1945; Pazur, 1965; Greenwood, 1956). Ambos componentes pueden separarse mediante diversos métodos (leaching acuoso, tratamiento ácido o alcalino, electroforesis, retrogradación, adsorción selectiva); sin embargo, la precipitación selectiva de la fracción amilosa con compuestos orgánicos polares es el método más satisfactorio de fraccionamiento del almidón (Schoch, 1945; Greenwood, 1956; Muetgeert, 1961; Young, 1984).

Amilosa, está constituida por unidades de glucosa unidas mediante enlaces α -D-(1 \rightarrow 4) lo que da como resultado largas cadenas lineales con una longitud promedio de 200-300 unidades de α -D-glucosa (Schoch, 1945; Greenwood, 1956; Manners, 1962; Whistler and Daniel, 1984).

La constitución de amilopectina, es indudablemente más compleja que la de amilosa ya que las unidades de D-glucosa se enlazan mediante uniones glucosídicas α -D-(1 \rightarrow 4) y α -D-(1 \rightarrow 6) formando una estructura ramificada con un promedio de una ramificación por cada 18-28 unidades de D-glucosa (Young, 1984); en éstas últimas uniones se originan los puntos de ramificación de la molécula.

Se ha sugerido, la presencia en algunos almidones de una pequeña fracción intermedia entre amilosa y amilopectina, así como la posibilidad de ciertas uniones α -D-(1 \rightarrow 6) en amilosa y ramificaciones mediante enlaces α -D-(1 \rightarrow 3) y α -D-(1 \rightarrow 2) en amilopectina (Manners, 1962; Wolfron and El-Kadem, 1965; Whistler and Daniel, 1984).

Los almidones contienen a menudo constituyentes menores que pueden modificar sus propiedades físicas. Muchos contienen ácidos grasos, fósforo (asociado principalmente a la fracción amilopectina del almidón de patata contribuyendo a la polaridad de este componente), nitrógeno y trazas de otros elementos (Greenwood, 1956; Gracza, 1965; Schoch, 1945; Whistler and Corbet, 1957).

1.3.1.2. Tipos de almidones

Los materiales de partida para la obtención de almidones son muy diversos ya que éstos pueden obtenerse de plantas, algunos protozoos, algas y bacterias (Shannon and Garwood, 1984).

Dependiendo de su procedencia se observan diferencias en cuanto al tamaño y forma de los gránulos, t^a de gelatinización en agua, tasa de hinchazón en varios solventes, grado de isotropismo a la luz polarizada y grado de complejación con yodo (Greenwood, 1956; Whistler and Corbet, 1957). También se observan diferencias en cuanto a su composición química ya que, aunque generalmente la proporción de amilosa y amilopectina en el almidón es de 1:3, ésta es variable de unos almidones a otros; si bien, amilosa es el componente minoritario en el almidón, el contenido en ésta de ciertos cereales y almidones de legumbres puede ser de hasta un 75%, pudiendo incluso estar ausente o en cantidad no mayor del 6% como ocurre en las variedades waxy (Pazur, 1965; Whistler and Corbett, 1957; Shannon and Garwood, 1984).

Además del origen y del porcentaje de las fracciones constituyentes en la molécula de almidón, las diferencias entre los distintos preparados se encuentran también en las modificaciones que han sufrido, bien por oxidación, calentamiento o hidrólisis; estas modificaciones normalmente conllevan alteraciones en las propiedades físicas de los almidones (viscosidad, solubilidad, retrogradación) (Whistler and Corbet, 1957; Schoch, 1945). Así pues, el almidón nativo (no degradado) no se disuelve en forma diáfana aún en agua hirviendo y se engrudiza al enfriar, no obstante, a partir de este almidón y mediante tratamiento con CIH, podemos obtener un almidón soluble parcialmente degradado que se disuelve bien y en forma diáfana en agua caliente, pero que al enfriarse por debajo de 50°C produce un enturbiamiento opalescente (ej: Almidón soluble 1252 Merck, utilizado normalmente para elaborar el Medio Granada) (de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1992a).

Algunos de los tipos de almidones más empleados son:

El almidón soluble tipo Lintner, que es un almidón parcialmente susceptibilizado con ácidos, soluble en agua caliente, no reductor que en su grado de hidrólisis se asemeja al almidón Merck 1252. Las moléculas en estos tipos de almidones son en promedio aún tan grandes que el compuesto de inclusión con yodo se obtiene con buena reproducibilidad (Información Técnica, Laboratorios Merck).

El almidón soluble Zulkowsky, es un almidón más degradado que el anterior por lo que puede disolverse incluso en agua fría. La modificación se realiza por calentamiento con glicerol a 190° C (Whistler and Corbet, 1957)

1.3.1.3. Propiedades del almidón y sus fracciones

Solubilidad y fenómeno de retrogradación

El solvente de mayor interés para las fracciones del almidón es el agua; amilopectina forma soluciones acuosas relativamente estables (Foster, 1965) mientras que la fracción amilosa no se disuelve directamente en agua o al menos solamente se disuelve hasta un límite.

El procedimiento usual cuando se requiere una solución acuosa neutra es disolver amilosa en 0'1-1 N de NaOH o KOH y después neutralizar, sin embargo, pasado un tiempo tras la neutralización la amilosa precipita; este es el conocido fenómeno de la retrogradación (Foster, 1965).

Este término, se ha empleado en el campo del almidón desde hace unos 60 años para describir el proceso por el cual el almidón en estado disuelto o hidratado revierte a una forma insoluble en agua. La retrogradación se acompaña de opalescencia, resistencia a la acción enzimática y disminución en la viscosidad de las soluciones (Greenwood, 1956; Wistler and Corbet, 1957; Foster, 1965).

El hecho de la retrogradación puede implicar interacciones entre moléculas próximas, alineación, expulsión de agua y formación de nuevas fuerzas intermoleculares; en definitiva, es un proceso complejo donde es importante

considerar algunos factores que pueden afectar a su tasa de presentación (Foster, 1965). En general, este fenómeno es favorecido por bajas temperaturas, pH neutro, grado de polimerización relativamente bajo, ausencia de ramificaciones en la molécula, concentración elevada, presencia de iones y de otras sustancias deshidratantes (Whistler, 1965; Young, 1984).

Las moléculas de amilosa debido a su naturaleza lineal coalescen y retrogradan mucho mas rápidamente que la fracción amilopectina (Whistler and Corbet, 1957); por ello, este fenómeno se atribuye específicamente a la fracción amilosa (Schoch, 1945). No obstante, es posible estabilizar esta fracción mediante formación de complejos, ya que en su forma estable o complejada, se encuentra en forma de hélice pero en retrogradación las cadenas se alinean formando una estructura cristalina (Greenwood, 1956).

Gelatinización

La diferenciación entre retrogradación y gelatinización del almidón es arbitraria, ya que en ambos procesos están implicados los mismos tipos de fuerzas (Schoch, 1945); no obstante, la gelatinización se considera como una asociación rápida y al azar de moléculas lineales mientras que por el contrario la retrogradación es un proceso relativamente lento que ocurre en un periodo de horas o días (Schoch, 1945).

Formación de complejos

Amilosa puede formar complejos con una gran variedad de compuestos orgánicos, propiedad utilizada no solo en el fraccionamiento de la molécula de almidón sino también en la industria alimenticia (Young, 1984; Moore et al., 1984); por su parte, amilopectina puede formar complejos con proteínas. De un especial interés en este trabajo, es la formación de complejos de almidón con compuestos

inorgánicos y en particular con yodo (BeMiller, 1965).

La reacción con yodo para formar el típico complejo azul-violeta es una de las reacciones más antiguas y mejor conocidas del almidón así como una de las que han sido objeto de mayores investigaciones. Meyer y col. demostraron que la coloración del almidón con yodo era debida principalmente al componente amilosa, ya que ésta se tiñe de color azul intenso mientras que la fracción amilopectina se tiñe mucho más débilmente (Foster, 1965).

Las características propiedades de absorción del complejo yodo-almidón son la base de la detección de almidones, diferenciación de almidones ordinarios de las variedades waxy, seguimiento de reacciones hidrolíticas, degradación del almidón o de sus fracciones y de la diferenciación de la fracción amilosa de la fracción amilopectina (Foster, 1965).

Yodo en solución acuosa de yoduro potásico exhibe una amplia y débil absorción con un máximo cercano a 450nm; con la adición de amilosa este pico cambia hacia longitudes de onda mayores dando un pico de absorción mucho más intenso a 600nm, lo que se traduce en un cambio de color de amarillo débil a azul intenso. Amilopectina origina un cambio menor con un pico de absorción a 550nm (Foster, 1965).

La afinidad del yodo por amilosa depende de la longitud de su cadena, presentando las cadenas mas cortas menor afinidad; amilopectina puede absorber yodo aunque a concentraciones mas elevadas y con menor rapidez debido a que su estructura ramificada causa limitaciones estéricas y porque el promedio de longitud de sus cadenas es bastante menor en comparación con las de amilosa (Whistler, 1965).

Se han realizado muchos estudios para conocer la estructura del complejo de almidón con yodo. Hanes en 1937, sugirió una estructura helicoidal, en base a que dextrinas que contenían menos de 6 residuos de D-glucosa no formaban complejo coloreado. Análisis de rayos X de los cristales del complejo amilosa-yodo, apoyan

que éste es helicoidal con 6 residuos de D-glucosa por vuelta y que las moléculas de yodo se encuentran en el interior de la hélice del polímero, a razón de 2 átomos de yodo por vuelta de ésta. Esta estructura es similar a la de otros complejos de amilosa (Wolfson and El-Kadem, 1965; Foster, 1965; Greenwood, 1956).

Se ha cuestionado bastante el papel del ión yoduro en la reacción amilosa-yodo y aunque su papel exacto no está muy claro parece ser esencial en la formación del complejo. Amilosa en forma cristalina o configuración helicoidal es capaz de absorber vapor de yodo y formar complejo azul sin necesidad de yoduro, pero no es capaz de cambiar el color del yodo en presencia de la cantidad suficiente de ácido yódico como para reprimir la hidrólisis de yodo a yoduro; por otro lado, α -ciclodextrinas son capaces de formar complejo en presencia de ácido yódico. Estos hechos sugieren que amilosa en solución acuosa existe en forma no helicoidal y que el ión yoduro presumiblemente es necesario para la formación de la hélice, por lo que parece que el papel del yoduro es promover la agregación necesaria para la formación de complejo (Foster, 1965).

1.3.1.4. Hidrólisis enzimática del almidón

Existen 2 grupos de enzimas que atacan las uniones α -D-(1 \rightarrow 4): amilasas, que atacan a la unión glucosídica misma y transglucosidasas que transfieren residuos D-glucosídicos a una molécula aceptora que contiene también uniones glucosídicas α -D-(1 \rightarrow 4); estas últimas no solo intervienen en la hidrólisis sino también en el proceso de síntesis de estas uniones (Manners, 1962).

Se conocen diferentes tipos de amilasas, clasificadas en base a diferentes criterios, tales como tipo de ataque al sustrato, origen, configuración del carbono anomérico de sus productos, productos finales, etc (Robyt, 1984).

β -amilasa: La nomenclatura propuesta para este enzima es α -D-(1 \rightarrow 4)-glucan maltohidrolasa; realiza una hidrólisis del almidón a maltosa y una dextrina límite de

elevado peso molecular (β -dextrina). El enzima libera maltosa en configuración β y puesto que no hay evidencia de uniones β -D-glucosídicas en el almidón, durante la hidrólisis de éste por β -amilasa ha de ocurrir una inversión de la configuración de la unión D-glucosídica, de ahí deriva la denominación dada al enzima para diferenciarlo de las α -amilasas (Pazur, 1965; Myrback, 1948; Manners, 1962).

En extractos crudos la β -amilasa suele estar contaminada con trazas de α -amilasa, pero ésta última puede ser destruída por ácido acético y mantenimiento de la solución a 0°C y pH 7,6 (Myrback, 1948); por otro lado, la β -amilasa se inactiva rápidamente por calentamiento a 70°C (Whistler and Corbet, 1957; Myrback, 1948).

En la acción de β -amilasa sobre el almidón, está bien establecido que el enzima comienza en los extremos no reductores de las cadenas externas y paso a paso separa unidades de maltosa. Amilosa con un número par de unidades de D-glucosa es convertida rápidamente a maltosa mientras que la amilosa con número impar de unidades de D-glucosa es transformada en maltosa y maltotriosa conteniendo ésta la unidad de D-glucosa reductora de la molécula original de amilosa; solamente el 55% de amilopectina es convertida en β -maltosa, debido a que β -amilasa no puede hidrolizar las uniones intercadenas α -D-(1 \rightarrow 6) por lo que su acción es incompleta produciéndose dextrinas límite de elevado peso molecular que contienen todas las uniones α -D-(1 \rightarrow 6) de la molécula original (Manners, 1962; Robyt, 1984). La extensión de la degradación de la molécula de amilopectina queda determinada por la longitud relativa de las cadenas exteriores (Pazur, 1965).

Entre otras enzimas implicadas en la hidrólisis del almidón destacan: **α -amilasas**, las cuales difieren marcadamente de las β -amilasas en su acción, al promover una fragmentación al azar de la molécula de almidón hidrolizando las uniones glucosídicas α -D-(1 \rightarrow 4) tanto de cadenas externas como internas en la molécula, provocando un rápido descenso en la turbidez, viscosidad y poder de tinción con yodo (Manners, 1962; Whistler and Corbet, 1957; Robyt, 1984). El enzima **Glucoamilasa** por otro lado, es capaz de hidrolizar completamente amilosa y amilopectina hasta D-glucosa al catalizar la hidrólisis de uniones α -D-(1 \rightarrow 4) y α -D-(1 \rightarrow 6).

No obstante y como consecuencia, de los patrones de acción de α y β amilasas otros enzimas pueden participar en la hidrólisis completa de almidón a D-glucosa: enzimas desramificantes como el enzima-R y amilo-(1 \rightarrow 6) glucosidasas, oligosacárido hidrolasas, dextrinasas límite, etc (Pazur, 1965; Robyt, 1984).

1.3.2. Proteosa Peptona

1.3.2.1. Hidrolizados proteicos como constituyentes de medios de cultivo bacterianos

Las proteínas en medios de cultivo bacterianos pueden ejercer una función nutritiva, protectora (absorbiendo materiales tóxicos) o indicadora de alguna actividad biológica (Bridson, 1978).

Los hidrolizados proteicos son ampliamente utilizados y su incorporación a medios de cultivo proporciona una fuente fácilmente disponible de nitrógeno y carbono (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970). Otras ventajas derivadas de la utilización de estos hidrolizados son su solubilidad total, estabilidad al calor y una gran resistencia a la precipitación frente a muchos agentes, como el pH y los iones metálicos (Fox et al., 1982).

Los hidrolizados proteicos se obtienen mediante la ruptura de los enlaces peptídicos, produciéndose péptidos y eventualmente aminoácidos; esta degradación o hidrólisis se ha llevado a cabo tradicionalmente mediante procesos catalizados por ácidos y bases fuertes, aunque sin embargo, cada vez son más los procesos basados en el uso de proteasas (hidrólisis enzimática) (Manual Oxoid, Oxoid Ltd., 1988, Basingtoke, England).

La hidrólisis con ácidos es inespecífica, ya que éstos atacan todas las uniones peptídicas degradando proteínas y polipéptidos a pequeños péptidos y aminoácidos.

Los datos analíticos de estos hidrolizados muestran un elevado contenido en nitrógeno amínico en comparación con los de digestos enzimáticos y presencia de ClNa formado al neutralizar el ácido con NaOH. Por otra parte, y debido a las condiciones de reacción tan severas, se produce una completa destrucción del triptófano, pérdida severa de cistina y pérdidas menores de serina y treonina; asparagina y glutamina son convertidas en sus formas ácidas (Manual Oxoid, Oxoid Ltd., 1988, Basingtoke, England; Bridson and Brecker, 1970).

La hidrólisis alcalina se utiliza en algunos casos para prevenir la destrucción de triptófano pero se produce una pérdida parcial o destrucción completa de cisteína, cistina y arginina. Ambos tratamientos alteran las propiedades nutricionales de los hidrolizados al provocar la destrucción de vitaminas (Bridson, 1978).

La hidrólisis enzimática es un proceso muy eficiente, que puede llevarse a cabo en condiciones suaves de temperatura, pH y presión, con lo cual la calidad nutricional de los aminoácidos se mantiene prácticamente inalterada, puesto que no tiene lugar la destrucción o modificación de ciertos restos aminoacídicos, como ocurre en el caso de la hidrólisis química.

En la hidrólisis mediante enzimas se evita la neutralización de los hidrolizados, y por tanto el alto contenido en sales que limitaría en cierto modo sus aplicaciones (Fox et al., 1982).

La digestión enzimática no lleva a una hidrólisis total de la proteína en aminoácidos sino que se obtienen hidrolizados parciales que generalmente originan mejor crecimiento que los hidrolizados completos o mezclas de aminoácidos y que contienen polipéptidos de una longitud de cadena variable dependiendo de la frecuencia de la unión aminoacídica específica (Meynell and Meynell, 1970); los productos de la digestión comúnmente llamados peptonas por lo tanto, son una mezcla mal definida de polipéptidos, oligopéptidos, aminoácidos, bases nitrogenadas orgánicas, sales y elementos trazas. Aunque tales peptonas son de composición no definida, al controlar el proceso de digestión es posible estandarizar los productos, de tal forma que, las características finales sean reproducibles de lote a lote (Bridson, 1978).

Entre los sustratos empleados para la elaboración de hidrolizados se encuentran proteínas animales, vegetales y de microorganismos: carne, pescado, caseína, gelatina, queratina, proteínas de soja, microorganismos (algas, bacterias y levaduras), albúmina de huevo, semilla de girasol, etc. (Manual Oxoid, Oxoid Ltd., 1988, Basingtoke, England; Bridson and Brecker, 1970; Bridson, 1978).

La elección de la fente proteica es de crucial importancia ya que la calidad del hidrolizado no será mayor que la de la proteína de origen (Bridson, 1978). En general, las proteínas de carne proporcionan peptonas de muy alta calidad; las proteínas de pescado debido a su alto contenido en ácidos grasos insaturados se oxidan rápidamente produciendo enranciamiento. Las proteínas de la leche (caseína, lactoalbúmina) proporcionan peptonas de alta calidad aunque ésta puede variar según su origen y proceso de obtención debiendo emplearse aquellas que poseen menor contenido en lactosa (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970); la gelatina, proteína extraída del colágeno, presenta un elevado contenido en prolina e hidroxiprolina y el análisis de las peptonas de esta proteína revela poco o ningún contenido en aminoácidos sulfurados; para la mayoría de los microorganismos las peptonas de gelatina muestran poca estimulación del crecimiento (Bridson and Brecker, 1970).

La calidad del residuo proteico de harina de soja, semilla de algodón, semilla de girasol, varía de acuerdo al proceso y temperaturas utilizadas para su obtención aunque en general, las peptonas obtenidas de plantas suelen presentar bajo contenido en lisina (Bridson and Brecker, 1970).

No solamente es importante en la elección de un hidrolizado proteico considerar la fuente proteica sino también el método de hidrólisis empleado y el enzima (en caso que se trate de hidrólisis enzimática), ya que algunos aminoácidos pueden destruirse durante el proceso o bien no encontrarse disponibles (Bridson, 1978).

Una determinada peptona no puede satisfacer todos los propósitos microbiológicos, por lo que cada una de ellas es particularmente útil para un propósito especial y posee características singulares que la diferencian de las demás;

ligeras modificaciones o cambios en los métodos de obtención pueden llevar a productos que poseen muy diferentes propiedades nutricionales (Manual Difco, Detroit).

Es conocido que, una peptona apropiada para el crecimiento de un microorganismo a menudo no puede satisfacer la formación de un producto final de éste (Bridson, 1978); Nekvasilova y col. (1970), describieron una mayor producción de α -toxina por *Clostridium perfringens* en presencia de hidrolizado enzimático de caseína, realizando mediante filtración en gel, el aislamiento de los péptidos esenciales del digesto requeridos para el crecimiento y toxinogénesis de este microorganismo (Nekvasilova et al., 1970); también se sabe que, la producción de toxina en *Corynebacterium diphtheriae* depende entre otros factores de la composición de la peptona presente en el medio de cultivo (Bridson, 1978; Manual Difco, Detroit); de igual modo, peptonas altamente tamponadas pueden ser inapropiadas para estudios de fermentación de carbohidratos (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970); la presencia de metales en la peptona también influye en su calidad y capacidad de reacción específica (concretamente el contenido en hierro de peptonas puede ser crítico en hidrolizados proteicos utilizados en medios para producción de toxinas) (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970). Todo ello, justifica la gran variedad de hidrolizados disponibles comercialmente para su empleo en la elaboración de medios de cultivo bacterianos.

1.3.2.2. Proteasas empleadas en la preparación de digestos proteicos

Tripsina: Es una endopeptidasa que ataca las uniones peptídicas entre grupos carboxílicos de lisina y arginina y los grupos amino de cualquier otro aminoácido. Se utiliza en el rango de pH=7-9, pero debido a su gran tendencia a la autólisis no permanece activa a pH elevados durante largos periodos de tiempo. La autólisis es retardada considerablemente en presencia de iones Ca^{2+} .

El enzima no se inactiva por reductores ni oxidantes, aunque sí por algunas proteínas de soja, habas, judías, trigo y ovomucoide (Bridson, 1978; Bridson and

Brecker, 1970).

Pepsina: Es estable a pH = 5-6 y se desnaturaliza por encima de pH=6. La máxima actividad catalítica se obtiene a pH= 1,8, pero a este pH es parcialmente inestable debido a autodigestión (Bridson, 1978).

Presenta en cierto modo amplia especificidad, pero se favorece la ruptura de las uniones adyacentes a aminoácidos aromáticos (Bridson, 1978).

Papaína: Es una cistein-proteasa y como tal se inhibe por todos aquellos agentes modificadores de grupos sulfidrilos (oxidantes, metales pesados, alquilantes), por lo que para su actividad se requiere la protección de su centro activo mediante la adición de agentes reductores como cisteína o sulfuro de hidrógeno.

Presenta una marcada estabilidad a elevadas temperaturas comparada con otros enzimas proteolíticos, de modo que puede realizarse la digestión a 70°C (Bridson and Brecker, 1970). La máxima actividad enzimática se encuentra en el rango de pH 5-7,5. Posee una amplia acción hidrolítica similar a la de pepsina (Bridson, 1978).

Bromelina, Ficina, y diversas proteasas microbianas aunque por el momento no son de empleo frecuente en la producción industrial de hidrolizados proteicos, poco a poco, sobre todo las últimas están adquiriendo importancia en la producción industrial de peptonas (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970).

1.3.2.3. Análisis y caracterización de hidrolizados proteicos

La acción de una peptona como aporte de factores de crecimiento para una bacteria es muy complicada y el suministro de péptidos en ciertas combinaciones de aminoácidos puede ser la parte más crítica de esta acción (Bridson and Brecker, 1970).

Es extremadamente difícil obtener un análisis completo de una peptona debido a la naturaleza heterogénea de sus componentes (Bridson, 1978), no obstante el contenido en nitrógeno de la peptona caracteriza parcialmente el digesto (Bridson and Brecker, 1970).

El análisis clásico de peptonas se restringe a determinar los tipos individuales de nitrógeno combinado junto con un análisis de los aminoácidos presentes. Dependiendo del sustrato proteico, del enzima usado, proporción enzima/sustrato y tiempo de hidrólisis, los componentes nitrogenados en una peptona se encontraran en diferentes relaciones cualitativas y cuantitativas (Bridson and Brecker, 1970).

La relación nitrógeno amínico/nitrógeno total, mide el grado de degradación de la peptona y esta medida junto con los datos clásicos caracteriza de algún modo la peptona pero aporta pocos datos de la proporción de polipéptidos, péptidos y aminoácidos presentes en ella (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970).

Es también muy útil, el conocimiento de la distribución de nitrógeno como proteosas, pequeños péptidos, aminoácidos, etc., ya que diferentes microorganismos cuando crecen en medios sólidos que contienen peptonas que difieren en estas distribuciones exhiben variaciones en tamaño colonial, apariencia, hemólisis, etc (Bridson and Brecker, 1970). Se incluyen así mismo, en la mayoría de los análisis de peptonas, el contenido en ClNa, fosfatos, reacción de pH y vitaminas (Bridson, 1978).

En la tabla III, se detallan algunos análisis típicos de varias peptonas comerciales.

En la Tabla IV, mencionamos las características de algunos hidrolizados proteicos empleados en la elaboración de medios de cultivo, clasificados según su proteína de origen. En algunos hidrolizados, los productores no detallan la fuente proteica ni los enzimas utilizados en la digestión (Manual Oxoid, Oxoid Ltd., Basingtoke, England; Bridson, 1978; Marchal et al., 1991).

Tabla III. Análisis típico de algunos hidrolizados proteicos comerciales

	Proteosa Peptona	PP Nº3	Peptona	Triptona	Extracto Levadura	Casaminoácidos
(% w/w)						
Nitrógeno total	14,37	13,06	16,16	13,14	9,18	11,15
N proteosa 1º	0,60		0,06	0,20		
N proteosa 2º	4,03		0,68	1,63		
N peptona	9,74		15,38	11,29		
N amonio	0,00		0,04	0,02		
N amino libre	2,66		3,20	4,73		
N amida	0,94		0,49	1,11		
N mono-amino	7,61		9,42	7,31		
Arginina	6,8	5,9	8,00	3,3	0,78	3,8
Acido aspártico	7,4	6,6	5,9	6,4	5,1	0,49
Cistina (Sullivan)	0,56		0,22	0,19		
Acido glutámico	12,0	11,2	11,0	18,9	6,5	5,1
Glicina	11,6	8,9	23,0	2,4	2,4	1,1
Histidina	1,7	1,7	0,96	2,0	0,94	2,3
Isoleucina	3,3	3,3	2,0	4,8	2,9	4,6
Leucina	6,4	6,0	3,5	3,5	3,6	9,9
Lisina	5,3	5,1	4,3	6,8	4,0	6,7
Metionina	2,0	1,8	0,83	2,4	0,79	2,2
Fenilalanina	3,3	3,1	2,3	4,1	2,2	4,0
Treonina	3,5	3,2	1,6	4,1	3,4	3,9
Triptófano	0,72	0,85	0,42	1,45	0,88	0,8
Tirosina	3,4	0,36	2,3	7,1	0,60	1,9
Valina	4,4	4,0	3,2	6,3	3,4	7,2
Piridoxina (µg/g)	3,0	4,1	2,5	2,6	20,0	0,073
Biotina	0,43	0,24	0,32	0,36	1,4	0,102
Tiamina	3,0	2,7	0,5	0,33	3,2	0,12
Acido nicotínico	131,0	169,0	35,0	11,0	279,0	2,7
Riboflavina	11,0	13,0	4,0	0,18	19,0	0,03
Fósforo (% w/w)	0,24	0,079	0,04			
Hierro	0,0038	0,0044	0,0023	0,0071	0,028	0,0006
Potasio	0,70	0,21	0,22	0,30	0,042	0,88
Sodio	2,84	0,033	1,08	2,69	0,32	0,77
Magnesio	0,118	,00048	0,056	0,045	0,030	0,0032
Calcio	0,137	,0396	0,058	0,096	0,040	0,0025
Cloro	3,95		0,27	0,29		
Cloruro	3,9	4,15	0,27	0,29	0,190	11,2
pH soluc. 1%	6,8		7,0	7,2		

Fuente comercial: Laboratorios Difco, Detroit, Michigan

Tabla III (Continuación)

	Hidrolizado Lactoalbúmina	Proteosa Peptona	Peptona Soja	Triptosa	Hidrolizado ácido de caseína
(% w/w)					
Nitrógeno total	12,5	13,6	9,3	12,7	8,3
Nitrógeno amino	6,1	3,6	2,2	3,7	4,8
N amino/total	49,0	26,4	23,7	29,1	57,8
N amonio	1,29	0,92	0,96	0,84	0,62
Carbohidratos	-	-	13,9	-	-
Alanina	4,58	4,95	2,52	3,53	1,64
Arginina	3,07	3,43	5,03	2,71	1,68
Acido aspártico	10,49	6,82	7,94	6,15	4,04
Cistina	2,60	0,59	0,80	0,40	0,13
Acido glutámico	15,94	12,29	14,68	15,37	15,29
Glicina	1,84	7,59	2,98	4,49	1,09
Histidina	1,78	1,53	1,70	1,68	0,42
Isoleucina	4,97	2,15	2,50	2,72	2,50
Leucina	10,70	4,70	4,46	5,05	4,33
Lisina	11,25	5,65	3,92	6,17	5,14
Metionina	1,3	1,22	0,55	1,22	1,85
Fenilalanina	3,08	2,55	3,01	2,83	2,89
Prolina	4,06	4,36	3,64	5,19	5,54
Serina	1,70	0,68	0,68	0,86	0,93
Treonina	3,24	1,70	1,38	1,66	1,47
Triptófano	1,32	0,61	0,69	0,86	-
Tirosina	0,67	2,13	2,36	1,78	2,08
Valina	3,92	3,04	3,10	3,75	3,54
Calcio (ppm)	5100	980	930	2220	243
Cobre	1,3	3,5	3,7	2,25	1
Hierro	110	68	207	68	56
Magnesio	480	1130	2630	706	143
Potasio	0,85%	1,46%	2,90%	0,83%	0,27%
Sodio	0,92%	1,34%	1,10%	2,27%	13,5%
pH soluc.2%	6,3	7,0	7,0	7,0	7,0

Fuente comercial: Oxoid Ltd., Basingtoke, England

Tabla IV. Identificación, fuentes y características de algunos hidrolizados proteicos empleados en medios de cultivo bacteriológicos.

SUSTRATO	HIDROLISIS	DENOMINACION	CARACTERISTICAS
A) PEPTONAS DE CASEINA Y OTRAS PEPTONAS DERIVADAS DE LA LECHE			
Caseína	-Acidos	-Casaminocidos(Difco)	Hidrólisis de caseína con ClH bajo presión seguido de neutralización con NaOH. La hidrólisis es llevada a cabo hasta que todo el nitrógeno de la caseína es convertido en aminoácidos u otros componentes de relativa simplicidad química. A pesar de su deficiencia en cistina y triptófano es empleado como suplemento aminoácídico en medios de cultivo, siendo muy útil para estandarización.
		-Hidroliz. caseína(Oxoid) -Acidicasa(BBL.)	
	-Enzimas	-Triptona(Oxoid) * -Tripticasa (BBL.) -Casitona (Difco)	* Digesto pancreático de caseína que contiene proporciones variables de pequeños péptidos y aminoácidos, incluido el triptófano. Util en medios para producción de toxinas.
Lactalbumina	-Enzimas	-Hidrolizado lactalbumina(Difco) * -Lactalysate(BBL.)	* Digesto pancreático de esta proteína que contiene niveles elevados de aminoácidos esenciales. Peptona altamente nutritiva para lactobacilos, usada como suplemento aminoácídico.
Leche	-Enzimas	-Leche peptonizada (Difco, Oxoid, BBL.)	Usada en medios de cultivo para lactobacilos.
B) PEPTONAS DE CARNE			
Carne	-Pepsina	-Peptona (Difco *, Oxoid) -Proteosa Peptona (Difco **, Oxoid) -Myosate(BBL.)	*Bacto-Peptona(Difco) posee un elevado contenido en peptonas y aminoácidos y solamente una pequeña cantidad de proteosas y compuestos nitrogenados más complejos. **Las diferentes Proteosas Peptonas de Difco (PP, PP N°2, PP N°3), son digestos pépticos de tejido animal preparados bajo parámetros variables de digestión. Los estudios nutricionales sobre estas peptonas indican que PP N°3 produce mejor crecimiento de microorganismos fastidiosos en la mayoría de los medios de cultivo
		-Peptamina(Difco) * -Peptona P(Oxoid) -Thiotone(BBL.)	*Peptonas que contienen polipéptidos de pesos moleculares elevados, pobres en aminoácidos libres y ricas en azufre.
	-Trypsina	-BioMazine (BioMerieux) -Peptona Bacteriológica (Oxoid 1.37)*	*En general, contienen oligopéptidos, muchos aminoácidos libres y vitaminas. Proporcionan un desarrollo abundante y rápido de cultivos.
Gelatina	-Enzimas	-Peptona gelatina(Oxoid) -Gelysate(BBL.)	Peptonas de bajo valor nutricional; como la proteína de origen los digestos son ricos en glicina, prolina e hidroxiprolina pero carentes de cistina, cisteína y triptófano.
Higado	-Enzimas	-Digesto de hígado(Oxoid)	Empleado para cultivo de protozoos, hongos patógenos y saprofitos, bacterias y micoplasmas.
C) PEPTONAS VEGETALES			
Soja	-Enzimas	-Peptona de soja(Oxoid) * -Soytone(Difco) -Phytone(BBL.)	*Obtenida mediante hidrólisis con papaína. Posee elevado contenido en carbohidratos. Los microorganismos crecen rápidamente pero pueden exhibir una brusca disminución de la viabilidad. Ricas en vitaminas sobre todo en tiamina.
D) MEZCLAS DE PEPTONAS			
Mezcla de peptonas o desconocido	-Enzimas	-Triptosa(Difco, Oxoid) -Polipeptona(caseína + carne)(BBL.) -Biosate(caseína + levadura)(BBL.) -Neopeptona(Difco) -Protona(Difco) -Peptona micológica(Oxoid)	Algunas formulaciones de medios incluyen más de una peptona mezcladas en las proporciones óptimas para la obtención de un rápido crecimiento y de otras características bacterianas.
E) EXTRACTOS			
Carne		-Lab-Lemco(Oxoid)*	*El método usual de obtención consiste en suspender carne picada libre de grasas en agua y dejar la mezcla a 4° C toda la noche o a 60° C durante aproximadamente 3 horas con agitación. La carne se separa por filtración y las proteínas del filtrado que coagulan por el calor se separan por calentamiento a ebullición durante 15 minutos. El producto resultante de este proceso es una solución acuosa de péptidos, aminoácidos, fracciones de ácidos nucleicos, ácidos orgánicos minerales y vitaminas. También aporta metales, fosfatos, compuestos carbonados y factores esenciales de los que pueden carecer algunas peptonas. En el extracto concentrado se mantienen las vitaminas hidrosolubles aunque los niveles de tiamina se reducen.

Tabla IV (Continuación)

Levadura	Extracto levadura (Oxoid, Difco)	Solución concentrada de proteína de levadura hidrolizada, producida por la reacción autolítica de los enzimas proteolíticos de la célula sobre proteínas de levadura; constituido por una mezcla de aminoácidos, péptidos, vitaminas hidrosolubles, fracciones de ácidos nucleicos y compuestos carbonados (primariamente glucógeno y trehalosa). Poseen una elevada concentración de vitaminas y aminoácidos, incluido el triptófano.
----------	----------------------------------	--

* Debido a las posibles variaciones en los procedimientos de obtención de unas casas comerciales a otras, hemos hecho constar el productor de los hidrolizados descritos.

Referencias: Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970; Manual Oxoid, Basingtoke, Hampshire, England; Manual Laboratorios Difco, Detroit; Meynell and Meynell, 1970; Marchal et al., 1991.

1.3.3. Suero

1.3.3.1. Suero como constituyente de medios de cultivo bacterianos.

La sangre completa, es uno de los aditivos proteicos más usados en medios bacteriológicos con la finalidad de mejorar el crecimiento de microorganismos exigentes nutricionalmente o bien con una función diferencial; el origen de ésta puede afectar de forma importante no sólo al crecimiento de los microorganismos sino también a las características de éstos (Bridson, 1978). Sin embargo, existe un gran número de formulaciones que no incorporan sangre entera sino suero de diferentes especies animales, generalmente también con la finalidad de favorecer el crecimiento de los microorganismos aunque su papel no está totalmente establecido (de la Rosa et al., 1983; Ellinghausen and McCullough, 1965; Karayiannis and Hobson, 1981; Levy et al., 1983).

Parece no existir una única función del suero en los distintos medios de cultivo a los que se adiciona, ya que si bien, algunos microorganismos mejoran su crecimiento en medios que lo contienen, como es el caso de los micoplasmas (Meynell and Meynell, 1970), *Chlamydia trachomatis* (Karayiannis and Hobson, 1981), *Leptospira* (Ellinghausen and McCullough, 1985), éste no solamente provee nutrientes sino que también aporta factores no nutricionales.

El requerimiento de suero y la falta de crecimiento en su ausencia puede atribuirse no solo a las necesidades nutricionales ya mencionadas, sino también a la presencia de ácidos grasos u otras sustancias tóxicas en los materiales biológicos que se incluyen en la formulación, como peptonas, agar, etc. (ej. el agar nutriente inhibe el crecimiento de especies de *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, a menos que se adicionen agentes capaces de absorber ácidos grasos).

Se ha comprobado que el suero completo o albúmina de suero (fracción V) tienen un efecto protector ya que son capaces de absorber ácidos grasos eliminando el efecto inhibitorio del crecimiento e incluso en algunos casos de funciones específicas del microorganismo (esporulación, formación de cápsula, etc.); otros agentes que unen ácidos grasos son almidón soluble (0,15% P/V), Charcoal y resinas aniónicas mientras que otras proteínas o fracciones del suero son relativamente inefectivas (Meynell and Meynell, 1970; Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970).

Otra de las funciones del suero en los medios de cultivo es actuar como buffer (ej. suero caldo-glucosa), pudiendo reemplazarse en este caso por carbonato sódico o cualquier otro tampón (Bridson, 1978).

Además de las funciones reconocidas del suero para medios de cultivo en general, es de destacar y es de nuestro especial interés su función como coadyuvante en la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae* (de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1990a).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo han sido:

1. Evaluar la influencia de la composición del medio de cultivo en la formación de pigmento por *Streptococcus agalactiae*.
2. Determinar la influencia de las condiciones de incubación sobre la pigmentación de EGB.
3. Estudio de los componentes de medios de cultivo responsables de la producción de pigmento por *S.agalactiae*.

MATERIAL Y METODOS

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. CEPAS BACTERIANAS

Se han empleado 4 cepas de *S. agalactiae* aisladas de diversas muestras clínicas, todas ellas β -hemolíticas. Las cepas I, II y III se seleccionaron por la característica de ser pigmentadas en NGM (New Granada Medium) (de la Rosa et al., 1992a) y la cepa IV, no sólo por su intensa pigmentación en este mismo medio sino también por ser capaz de producir pigmento en placas de Agar Columbia + 5% de sangre de caballo (BioMedics).

Como medio de mantenimiento de estas cepas, hemos utilizado Cistina Tripticasa Agar (Difco 0523-01-7), así como subcultivos semanales en placas de Agar Columbia + 5% de sangre de caballo (BioMedics).

En la tabla V, se detalla el serotipo y procedencia de cada una de las cepas empleadas.

CEPAS	ORIGEN	SEROTIPO
I	Hemocultivo	Ia
II	Ex. ocular	III
III	Ex. vaginal	III
IV	Ex. vaginal	Ia/c

Tabla V. Serotipos y procedencia de las cepas bacterianas

Las cepas fueron identificadas por sus características morfológicas y bioquímicas (CAMP, hidrólisis de hipurato, resistencia a bacitracina y SxT, producción de pigmento) (McFaddin, 1980; Facklam and Washington, 1991; Sonnenwirth, 1983) y agrupadas serológicamente como pertenecientes al grupo B de estreptococos mediante aglutinación con partículas de látex (Streptococcal Grouping Kit, Oxoid Diagnostic Reagents).

La serotipia se realizó, previa extracción del antígeno con ácido clorhídrico 0,2 N en caliente, por precipitación capilar con antisueros cedidos por el Dr. H. W. Wilkinson del CDC (Carazo, 1991).

3.2. MEDIO DE CULTIVO BASE (MB)

Se utilizó como medio base el NGM (New Granada Medium) descrito por de la Rosa y col. (1992a), eliminando de la formulación original la adición de agentes selectivos. La composición para 1 litro de medio es la que sigue:

Proteosa peptona N° 3 (0120-01 Difco)	25 g
Almidón (1252 Merck)	20 g
D(+) Glucosa monohidrato (8342 Merck)	2,5 g
Sulfato de Magnesio anhidro (M-7505 Sigma)	0,2 g
Fosfato disódico anhidro (6586 Merck)	8,5 g
MOPS (sal hemisódica)(M-9027 Sigma)	11 g
Acido pirúvico (sal sódica) (6619 Merck)	1 g
Suero de caballo (SR-35 Oxoid)	50 ml
Metotrexato (Lederle)	6 mg/l
Agar bacteriológico (Oxoid)	10 g

Laboratorios Difco, Detroit, Michigan, USA; E. Merck, D-6100 Darmstadt, F.R. Germany; Sigma Chemical Company, St.Louis, USA; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England; Lederle (Cyanamid Iberica S.A.) Madrid, España.

Preparación

Añadir a 1 litro de agua destilada la proteosa peptona, almidón, $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, MOPS hemisódico y agar. Disolver calentando con agitación hasta que el medio quede totalmente transparente. Llevar a ebullición varias veces. Esterilizar en autoclave a 0,5 atmósferas de presión durante 20 minutos. Dejar enfriar hasta 50-55°C y añadir 10 ml de una solución previamente esterilizada por filtración que contiene: metotrexato 0,6 g/l, glucosa 250 g/l, SO_4Mg anhidro 20 g/l y 100 g/l de piruvato sódico. Añadir 50 ml de suero de caballo estéril. No es necesario ajustar el pH final, siendo éste de 7,4 +/- 0,2 (de la Rosa et al., 1992a).

3.3. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO BASE SOBRE LA FORMACION DE PIGMENTO POR EGB

3.3.1. Metodica de trabajo

Medios de cultivo

Los medios de cultivo mencionados en los epígrafes 3.3.2. y 3.3.3., se han realizado siguiendo el mismo procedimiento anteriormente descrito para la elaboración del Medio Base (MB) (Ver 3.2.).

En todos los casos, se han elaborado medios de cultivo distribuidos en placas Petri y en tubos de aproximadamente 10 mm de diámetro, diferenciándose ambos únicamente en el método de siembra seguido, como especificamos a continuación.

Inóculo bacteriano y siembra de medios de cultivo

Medios en Placa: La preparación del inóculo de siembra, se realizó a partir de un cultivo en Agar Columbia + 5% sangre de caballo incubado a 37°C durante

24 horas, tomando varias colonias e inoculándolas en 5 ml de Brain Heart Infusion (Difco 0037-01-9). Tras la incubación a 37 °C durante 18-24 horas, se procedió a la preparación del inóculo, tomando 40 μ l de este cultivo estacionario en caldo y suspendiéndolo en 5 ml de solución salina fisiológica. Una vez solidificado el medio, se depositó en la superficie de las placas, 20 μ l de esta dilución (aproximadamente $5,3 \times 10^4$ ufc/ml), dejándolas secar antes de proceder a su incubación.

Medios en Tubo: Se preparó una suspensión del microorganismo con 10 μ l del cultivo estacionario en caldo Brain Heart Infusion (BHI) en 5 ml de solución salina fisiológica. 100 μ l de esta dilución se añadieron a 5 ml del medio de cultivo distribuido en tubos, antes de solidificar, agitando lentamente para homogeneizar el inóculo de siembra (aproximadamente $6,6 \times 10^4$ ufc/ml).

Condiciones de incubación

Placas y Tubos del Medio Base (MB), se incubaron inicialmente en atmósfera anaerobia (5% CO₂, 10% H₂ y 85% N₂), en atmósfera con un 5% CO₂, atmósfera microaerófila (5% O₂, 10% CO₂ y 85% N₂) y en atmósfera normal (aire) siempre a 37 °C durante 18-24 horas. Tras esta experiencia preliminar, se utilizó en todos los casos únicamente una atmósfera de incubación dejándola restringida a la incubación en anaerobiosis.

Lectura e interpretación

Tras el periodo de incubación se anotó la presencia o ausencia de crecimiento de cada una de las cepas en los distintos medios de cultivo así como la intensidad de pigmento en cada uno de ellos.

Se estableció una graduación mediante cruces (+++, ++, +) para indicar la intensidad de pigmento observada, considerando como máxima la intensidad de

pigmento de tres cruces (+ + +) que es la correspondiente a la exhibida por las cepas I, II y III en el Medio Base sin modificaciones y en condiciones de incubación anaerobias (pigmento naranja intenso). En relación a ésta y dependiendo de la intensidad y tonalidad observada para el pigmento, se asignaron dos cruces (+ +) en caso de la visualización de un pigmento naranja no intenso y una cruz (+) en caso de observación de pigmento con una coloración naranja-amarillenta.

3.3.2. Eliminación individualizada de cada uno de los componentes del Medio Base (MB).

Para poner de manifiesto la influencia sobre la formación de pigmento de los componentes incluidos en la formulación del medio que hemos utilizado como base de nuestras experiencias, se han elaborado diversos medios de cultivo eliminando cada uno de los componentes incorporados en la formulación original.

Hemos elaborado por lo tanto, los siguientes medios:

Medio Base (MB) (control de pigmentación), MB sin Proteosa Peptona, MB sin almidón, MB sin Metotrexato, MB sin suero de caballo (estos 5 medios se incluyen también en el apartado 3.3.3.), MB sin $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, MB sin MOPS (sal hemisódica), MB sin piruvato sódico, MB sin glucosa y MB sin MgSO_4 .

3.3.3. Variación en la composición del Medio Base por eliminación de algunos de sus componentes.

Partiendo del Medio Base (Medio Granada sin inhibidores), se han elaborado los siguientes medios de cultivo (Tabla VI), utilizando como variables los siguientes componentes: Almidón, Proteosa Peptona, Metotrexato (MTX) y Suero de caballo, componentes que según experiencias realizadas por otros autores (Tapsall, 1986; de la Rosa et al., 1983) y por los resultados de las experiencias realizadas en 3.3.2.

parecen afectar de forma importante la pigmentación de EGB.

La incorporación de glucosa a estos medios de cultivo se ha utilizado como variable solamente en aquellos medios que incluyen en su composición proteosa peptona, metotrexato y suero, independientemente de la presencia o ausencia de almidón; en los demás casos, la glucosa se encuentra incluida en el medio.

Tabla VI. Variación en la composición del Medio Base por eliminación de algunos de sus componentes.

MEDIO	PP nº3	Almidón	MTX	Suero	Glucosa
Nº 1	+	-	-	-	+
Nº 2	+	-	-	+	+
Nº 3	+	+	-	-	+
Nº 4	+	+	-	+	+
Nº 5	+	-	+	-	+
6A					+
Nº 6B	+	-	+	+	-
Nº 7	+	+	+	-	+
8A					+
Nº 8B	+	+	+	+	-
Nº 9	-	+	-	-	+
Nº 10	-	+	-	+	+
Nº 11	-	+	+	-	+
Nº 12	-	+	+	+	+

PP nº3: proteosa peptona nº3 (Difco); MTX: metotrexato
 +: componente incluido en la formulación del medio de cultivo
 -: componente no incorporado al medio de cultivo

3.4. ESTUDIO DE ALMIDON COMO CONSTITUYENTE DEL MEDIO BASE

3.4.1. Modelo Experimental

Medios de cultivo y metódica de trabajo

El estudio de la actividad de diversos carbohidratos en la formación de pigmento por *S.agalactiae*, reemplazando como componentes al almidón incluido en la formulación original del Medio Base, se ha realizado de dos formas distintas:

a) Elaboración de diferentes medios de cultivo distribuidos en placas y en tubos (Modelo experimental placa-tubo) con cada uno de los carbohidratos a probar y a la misma concentración utilizada para el almidón, eliminando éste de la formulación original del Medio Base (MB sin Almidón + Carbohidrato).

b) Utilización de una técnica bioautográfica (Kennedy et al., 1955) modificada al sustituir los cromatogramas en papel por pocillos realizados en medios de cultivo distribuidos en placas Petri (utilizando MB en el que se elimina el componente almidón), los cuales incorporan los diferentes compuestos cuya actividad biológica se pretende conocer.

Inóculo bacteriano y siembra de medios de cultivo

Modelo experimental (Placa - Tubo): Los inóculos utilizados para la siembra de placas y tubos, fueron los detallados en 3.3.1.

Modelo bioautográfico: 50 μ l de un cultivo de *S.agalactiae* en caldo BHI incubado 18-24 horas, se adicionaron a 12 ml del medio de cultivo (MB sin Almidón) cuando éste se encontraba aún sin solidificar (sobrefusión), procediendo a su homogeneización y distribución en placas Petri. Transcurrido el tiempo necesario para la solidificación, se realizaron pocillos en el medio de cultivo empleando tubos de vidrio de diversos tamaños dentro de los cuales se introdujeron

disoluciones de los distintos carbohidratos a probar, permitiendo durante unos 15 minutos la difusión de éstos antes de proceder a la incubación que se realizó a 37° C durante 18-24 horas en atmósfera anaerobia (5% CO₂, 10% H₂, 85% N₂).

Lectura e interpretación

Modelo experimental (Placa - Tubo): Se anotó la intensidad de pigmento producida en placas y en tubos siguiendo una graduación mediante cruces (+ + +, + +, +) como se ha especificado en el apartado 3.3.1. Así mismo, se apuntaron diferencias importantes en cuanto al crecimiento de EGB en el Medio Base sin almidón adicionado de otros carbohidratos respecto al del Medio Base (MB).

Modelo bioautográfico: Se anotó la presencia o ausencia de halo de potenciación del pigmento alrededor de los pocillos (halo naranja) producido por los diferentes componentes ensayados.

3.4.2. Actividad de Almidón (Merck 1252) sobre la formación de pigmento por *S. agalactiae*

Medios que incorporan almidón a concentraciones del 2% (Medio Base), 1% y 0,5%, así como medios carentes de él (MB sin Almidón) distribuidos en placas y tubos, han servido de referencia y control de la pigmentación producida por EGB, dando cuenta al mismo tiempo de la actividad e importancia del almidón en la formulación (Fallon, 1974; de la Rosa et al., 1983).

En el caso de experiencias realizadas en placas con pocillos (MB sin Almidón) se utilizó como control de pigmentación, la incorporación a uno de los pocillos de 100 µl de una solución de almidón al 5%.

3.4.3. Actividad de diversos almidones y de sus fracciones sobre la formación de pigmento por *S. agalactiae*.

Se realizaron medios de cultivo (Modelo placa-tubo) incorporando un 2% de cada uno de los almidones citados a continuación. En el caso de amilosa y amilopectina, también se realizaron medios de cultivo a concentraciones finales del 0.5% y 1%.

En el estudio de la actividad de los distintos almidones y de las fracciones mediante bioautografía, se ensayaron 100 μ l de soluciones al 5% de todos ellos.

Almidones

Almidón de patata:

No modificado	Sigma S-4251
Soluble (Método Lintner)	Sigma S-2630
Hidrolizado para electroforesis ...	Sigma S-4501
Indicador yodométrico	Panreac- 171096
Soluble ACS Reactivo	Sigma S-9765
Zulkowsky	Merck 1257

Almidón de trigo:

Tipo I (no modificado)	Sigma S-5127
Purificado (hidroliz. calor)	Sigma S-2760

Almidón de arroz	Sigma S-7260
------------------------	--------------

Fracciones de Almidón

Amilosa de patata. Tipo III.....	Sigma A-0512
Amilopectina de patata	Sigma A-8515

3.4.4. Actividad de hidrolizados enzimáticos de almidón por acción de β -amilasa en la formación de pigmento por *S.agalactiae*

Experiencias previas

Debido a que en el proceso de hidrólisis de almidón y sus fracciones por acción del enzima β -amilasa se produce liberación de maltosa, y la utilización de este azúcar por el microorganismo lleva asociada una disminución de pH en el medio, se elaboraron los siguientes medios de cultivo con la finalidad de determinar la influencia de estas condiciones sobre la pigmentación de EGB.

- * Medio Base (incorpora un 2% almidón)
- * MB (2% almidón) + 2% maltosa
- * MB sin Almidón + 2% maltosa

- * MB (disminuyendo la concentración de almidón al 1%)
- * MB (1% almidón) + 1% maltosa
- * MB sin Almidón + 1% maltosa

Por otra parte y para comprobar que la β -amilasa no interfiere por sí misma en la producción de pigmento, hemos elaborado un medio de cultivo (MB) al que añadimos la misma cantidad de enzima que vamos a utilizar en el proceso de hidrólisis, inactivando ésta rápidamente antes del comienzo de su acción mediante calentamiento a ebullición durante 10-15 minutos (Whistler and Corbet, 1957).

Hidrólisis de almidón, amilosa y amilopectina

Soluciones al 2% de almidón y de sus fracciones, se llevaron a pH = 4-5 (necesario para la actividad enzimática) (Pazur, 1965). En los tres casos, se hicieron 2 alicuotas adicionando a una de ellas β -amilasa (Tipo II B A-7130 Sigma) en exceso

para asegurar una hidrólisis completa que se realizó a 37°C durante aproximadamente 24 horas; la segunda alicuota se mantuvo en iguales condiciones de incubación y pH que la primera pero sin la adición del enzima.

Una vez finalizado el tiempo de hidrólisis (determinado por la pérdida de la capacidad del hidrolizado para formar complejos con yodo) (Ver 3.4.5.), ambas alicuotas se calentaron a ebullición durante 10-15 minutos (Whistler 1957, Myrback 1948) con la finalidad de inactivar el enzima presente en la primera de ellas, se ajustó el pH a su valor inicial y se procedió a elaborar los siguientes medios en placa y en tubo.

- * Medio Base (disminuyendo la concentración al 1% de almidón)
- * Medio Base (sin Almidón)

- * Medio Base (1% Almidón) (C)
- * MB (sin Almidón) + 1% hidrolizado almidón con β -amilasa
- * MB (1% Almidón) + 1% hidrolizado almidón con β -amilasa

- * MB (sin Almidón) + 1% amilosa (C)
- * MB (sin Almidón) + 1% hidrolizado de amilosa con β -amilasa
- * MB (sin Almidón) + 1% almidón + 1% hidrolizado de amilosa con β -amilasa

- * MB (sin Almidón) + 1% amilopectina (C)
- * MB (sin Almidón) + 1% hidrolizado de amilopectina con β -amilasa
- * MB (sin Almidón) + 1% almidón + 1% hidrolizado de amilopectina con β -amilasa

En cada caso, los medios empleados como control de pigmentación (C), se elaboraron con almidón, amilosa y amilopectina, sometidos a las mismas condiciones de pH e incubación que las de sus correspondientes hidrolizados.

Monitorización de la hidrólisis del almidón

Se realizó también, la hidrólisis de una solución de almidón al 2%, utilizando una cantidad conocida y calculada previamente de β -amilasa de 0,01 g/20 ml de solución (cantidad suficiente para una hidrólisis no muy rápida que permite su monitorización). Las condiciones de pH y temperatura de incubación son las mismas que en el proceso hidrolítico anterior.

Tras la adición del enzima, se tomaron fracciones del hidrolizado de 2 en 2 minutos hasta un tiempo de 20 minutos de actuación enzimática y después a los 25', 30', 45' y 60 minutos del inicio de la hidrólisis, parando la actividad del enzima en cada una de las alicuotas por calentamiento a ebullición durante 10-15 minutos (Whistler and Corbet, 1957; Myrback, 1948).

Se determinó la capacidad de formar pigmento utilizando placas con pocillos (MB sin Almidón) a los que se incorporaron 100 μ l de los hidrolizados enzimáticos de almidón a diferentes tiempos de actuación del enzima; así mismo, se incorporaron en otros pocillos 100 μ l de una solución de almidón al 2% y de una solución de almidón al 2% sometida a las mismas condiciones de pH y temperatura que los hidrolizados a estudiar. Estos dos últimos sirvieron de control de pigmentación.

3.4.5. Formación de complejos con yodo.

Se determinó la capacidad de formar complejos con yodo de los diferentes tipos de almidones empleados en el estudio, fracciones de éste, polisacáridos, dextrinas, oligo y monosacáridos. Para ello, 40 μ l de una solución de I_2 (1%) y IK (2%), se añadieron a 5 ml de las soluciones de los distintos azúcares al 1%, observando y anotando el color desarrollado.

Los hidrolizados de almidón, amilosa y amilopectina con β -amilasa, así como cada una de las alicuotas del hidrolizado de almidón obtenido a diferentes tiempos de actuación del enzima también se probaron para determinar su grado de complejación con yodo.

3.4.6. Influencia de Almidón sobre el espectro de absorción del pigmento

Hemos determinado el espectro de absorción del pigmento formado por EGB en el Medio Base (MB), MB sin almidón, MB sin Metotrexato y MB sin Suero. Para ello, medios líquidos con estas formulaciones se inocularon con varias colonias de EGB y se incubaron en condiciones anaerobias a 37°C durante 18-24 horas. Pasado el tiempo de incubación se centrifugaron los caldos de cultivo, realizándose el espectro de absorción del sobrenadante, utilizando un HITACHI 220S (rango de muestreo 700 - 350 nm). Como blanco se emplearon los mismos medios sin inocular.

Así mismo, se ha determinado el espectro de absorción del Medio Base al que tras un periodo de incubación de 18-24 horas, se adicionó β -amilasa; en este caso como blanco se utilizó el MB sin inocular adicionado del enzima.

3.4.7. Actividad de Albúmina sobre la pigmentación de EGB.

Concentraciones finales en el medio del 2%, 1,5% y 1% de Albúmina bovina (fracción V) (Sigma A-9647) se han probado en sustitución del Almidón en el Medio Base. No obstante, para determinar el efecto sobre la pigmentación de la incorporación de ésta a medios de cultivo, se ha empleado a una concentración del 1%, elaborándose los siguientes medios (Tabla VII) en los que partiendo del MB se ha eliminado el componente almidón y/o suero y adicionado albúmina.

Como controles de pigmentación, se han utilizado estos mismos medios sin la adición de albúmina.

Tabla VII. Medios de cultivo empleados para determinar el efecto de la incorporación de albúmina en la formación de pigmento por EGB.

MEDIOS DE CULTIVO
Medio Base sin Almidón sin Suero + 1% Albúmina Bovina
MB sin Almidón + Suero + 1% Albúmina Bovina
MB + Almidón sin Suero + 1% Albúmina Bovina
MB + 1% Albúmina Bovina

Medio Base (MB): PP3 2'5%, Almidón 2%, Suero caballo 5%, Glucosa 0'25%, 0,02% Sulfato Magnesio, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS (sal hemisódica), Piruvato sódico 0'1%, 6µg/ml metotrexato y 1% agar.

3.4.8. Actividad de diversos carbohidratos en la formación de pigmento por *S. agalactiae*.

Tomando como partida el Medio Base y eliminando el componente almidón de su formulación, se realizaron tantos medios de cultivo en placas y tubos como carbohidratos citados a continuación. La concentración final de estos carbohidratos en el medio fue del 2%, la misma concentración utilizada en el Medio Base para Almidón.

En el modelo de placas con pocillos (Método bioautográfico), se incorporaron a éstos 100 µl de disoluciones al 5% de cada uno de estos carbohidratos.

Polisacáridos

Glucógeno de hígado bovino. Tipo IX ..	Sigma G-0885
Inulina	Merck 4733
Carboxi-metil-celulosa	Sigma C-4888
Metil-celulosa	Sigma M-7140
Celulosa Tipo 20 (Sigmacell)	Sigma S-3504

Celulosa fosfato	Sigma C-2258
Dextrano (Pm 500.000)	Sigma D-5251
<u>Dextrinas</u>	
Dextrina Tipo I de trigo	Sigma D-2006
α -ciclodextrina	Sigma C-4642
β -ciclodextrina	Sigma C-4767
<u>Oligosacáridos, di- y monosacáridos</u>	
Maltooligosacárido ($G_4 - G_{10}$)	Sigma M-3639
Maltopentaosa	Sigma M-8128
Maltotetraosa	Sigma M-8253
Maltotriosa	Sigma M-8378
Maltosa (monohidrato)	Merck 5910
D(+) glucosa (monohidrato)	Merck 8342
D-Xilosa (Bacto)	Difco 0181-13-6
Sacarosa	Merck 7651
Lactosa (monohidrato)	Merck 7657
Melibiosa (monohidrato)	Merck 12240
D(+) galactosa	Merck 4062
D(-) fructosa	Sigma F-0127
D(-) manitol	Merck 5982
D-manosa	Difco 0171-13
D-sorbitol	Sigma S-1876
Salicina	Merck 7665
Trehalosa (Bacto)	Difco 0180-12-8
Ramnosa	Difco 0175-15
L-arabinosa	Difco 0159-13-4
D(-) arabinosa	Sigma A-3131
L(-) sorbosa	Sigma S-2001
Rafinosa	Sigma S-7549

D(+) celobiosa	Sigma C-7252
β -gentibiosa	Sigma G-3000
Palatinosa	Sigma P-2007
Adonitol	Sigma A-5502
D(+) melecitosa	Sigma M-5375
D(+) turanosa	Sigma T-2754
Dulcitol	Sigma D-0256
Mio-inositol	Merck 4728
Xilitol	Sigma X-3375
Esculina	Difco 0158-12
D-amigdalina	Sigma A-6005
Acido D-glucónico	Sigma G-4500
Acido láctico	Sigma L-1375
β -glicerofosfato	Sigma G-6251
D-glucosa 6 fosfato	Sigma G-7879
1-o-metil- α -D-glucopiranosido	Sigma M-9376

3.5. ESTUDIO DE PROTEOSA PEPTONA COMO CONSTITUYENTE DEL MEDIO BASE

3.5.1. Modelo experimental

Medio de cultivo

Para el estudio de la actividad de Proteosa Peptona N^o3 (Difco) y sus análogos en la formación de pigmento por EGB, hemos diseñado un modelo experimental constituido por los siguientes medios de cultivo:

- * Medio Base (incorpora 2,5% Proteosa Peptona N°3) (PP3)
- * MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%)
- * MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0,5%)

Metódica de trabajo

Del mismo modo que en las experiencias realizadas con almidón, se han seguido dos procedimientos distintos:

a) Elaboración de medios de cultivo en placas y tubos, que incorporan el componente cuya actividad se pretende conocer. Para ello, se ha utilizado el Medio Base eliminando la Proteosa Peptona N°3 (MB sin PP3) e incorporando otros componentes en sustitución de ésta y a la misma concentración.

b) Utilización de una técnica bioautográfica, como hemos descrito en 3.4.1. En este caso, hemos empleado los 3 medios mencionados anteriormente y adicionado los diferentes componentes a ensayar, a pocillos realizados en el agar de placas presembradas.

Inóculo bacteriano y condiciones de incubación

Los inóculos bacterianos, métodos de siembra y condiciones de incubación empleados son los mencionados en 3.3.1. y 3.4.1.

Lectura e interpretación

Modelo experimental (Placa-Tubo): Se anotó la presencia o ausencia de crecimiento así como la intensidad de pigmento producido por EGB en los cultivos en placas y en tubos, como se ha mencionado en el apartado 3.3.1.

Modelo bioautográfico: Se anotó la presencia o ausencia de halo de potenciación del pigmento alrededor de los pocillos producido por los diferentes compuestos ensayados. En su caso, también se anotó un mayor crecimiento alrededor de los pocillos en relación al resto de la placa así como la capacidad de determinados compuestos para revertir el pigmento, puesto de manifiesto por la presencia de un halo de inhibición de éste alrededor de los pocillos.

La cuantificación de la actividad potenciadora e inhibidora mediante cruces, se ha basado en el tamaño del halo de activación o inhibición así como en la intensidad de potenciación o de reversión del pigmento observada para un determinado componente alrededor del pocillo en relación a la mostrada por la solución control.

3.5.2. Actividad de Proteosa Peptona N°3 (Difco) (PP3) sobre la formación de pigmento por *S.agalactiae*.

Se realizaron medios de cultivo en placas y tubos (diferenciados únicamente en el método de siembra) utilizando concentraciones del 2,5% (MB), 1% y 0,5% de Proteosa Peptona N°3 (Difco) así como medios carentes de ésta.

Por otra parte, se determinó la actividad de este hidrolizado proteico (PP3) incorporando alicuotas (100 μ l) de disoluciones de Proteosa Peptona N°3 a diferentes concentraciones (1'25%, 2'5%, 5%, 10% y 20%) a pocillos realizados en placas de cultivo con estos mismos medios.

Diálisis de Proteosa Peptona N°3 (Difco) (PP3)

La diálisis se ha realizado empleando membranas de celulosa regenerada (Medicell International). Las propiedades de permeabilidad de estas membranas permiten la difusión de compuestos de peso molecular (PM) menor de 10.000 daltons en solución acuosa, reteniendo a aquellos compuestos de mayor PM.

Obtención de los dializados

Se dializaron 20 ml de una solución al 10% de Proteosa Peptona N°3 (PP3) frente a un volumen igual de agua durante aproximadamente 30 horas, realizando todo el proceso a una temperatura de 4 °C para evitar la contaminación bacteriana. Así mismo, se dializaron 20 ml de una solución de PP3 al 10% frente a agua, eliminando el dializado y añadiendo un nuevo volumen de agua cada 3-4 horas (200 ml agua/cambio) realizando un total de 6 cambios.

Se determinó la actividad de los dializados y retenidos, mediante bioautografía con los 3 medios de cultivo anteriormente mencionados e incorporando un volumen de 100 μ l en cada uno de los pocillos. Ensayamos, por lo tanto:

- * PP3 dializada frente a un volumen definido de agua (Fracción retenida)
- * PP3 dializada frente a un volumen definido de agua (Dializado)
- * PP3 dializada frente a un volumen elevado de agua (Fracción retenida)

Ultrafiltración de Proteosa Peptona N°3 (PP3)

La obtención de los ultrafiltrados de Proteosa Peptona se ha realizado mediante el sistema de filtración tangencial Minitan-S (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730). Este sistema consta de una célula de filtración y una bomba peristáltica de velocidad variable con un cabezal y tubo flexible adecuado, capaces de proporcionar un caudal máximo de 480 ml/min. El empleo de una única lámina de membrana permite minimizar el volumen muerto del sistema, permitiendo éste el procesamiento de soluciones biológicas (100-500 ml) en flujo tangencial con membrana de microfiltración o ultrafiltración con un volumen final mínimo de 10 ml.

En general, macromoléculas mayores o iguales al límite de corte de las membranas quedan retenidas, dejando pasar el solvente y soluto de menor tamaño que formarían el ultrafiltrado. Si bien, la base de la separación es el peso molecular, la conformación y la carga de las moléculas también afectan en cierta medida al rendimiento (Harris, 1989).

Se han utilizado las siguientes membranas:

	NMWC*	Referencia
Membrana de Polisulfona	100.000	PTHKOMS10 (Millipore)
Membrana de Celulosa	10.000	PTGCOMS10 (Millipore)
Membrana de Celulosa	1.000	PCACOMS10 (Millipore)

* Nominal Molecular Weight Cut-off (NMWC). Definido como el peso molecular mínimo de una molécula globular que no es capaz de atravesar la membrana (Harris, 1969).

Obtención de los ultrafiltrados

Partiendo de una solución de Proteosa Peptona N°3 al 10% y siguiendo el esquema de la Figura 1, obtenemos las fracciones de PP3 con pesos moleculares teóricos > 100.000 y < 100.000 daltons. El volumen residual mínimo del sistema es de 10 ml. Mediante la adición repetida de agua a la fracción retenida al utilizar una membrana de NMWC 100.000, conseguimos una mayor pureza de ésta.

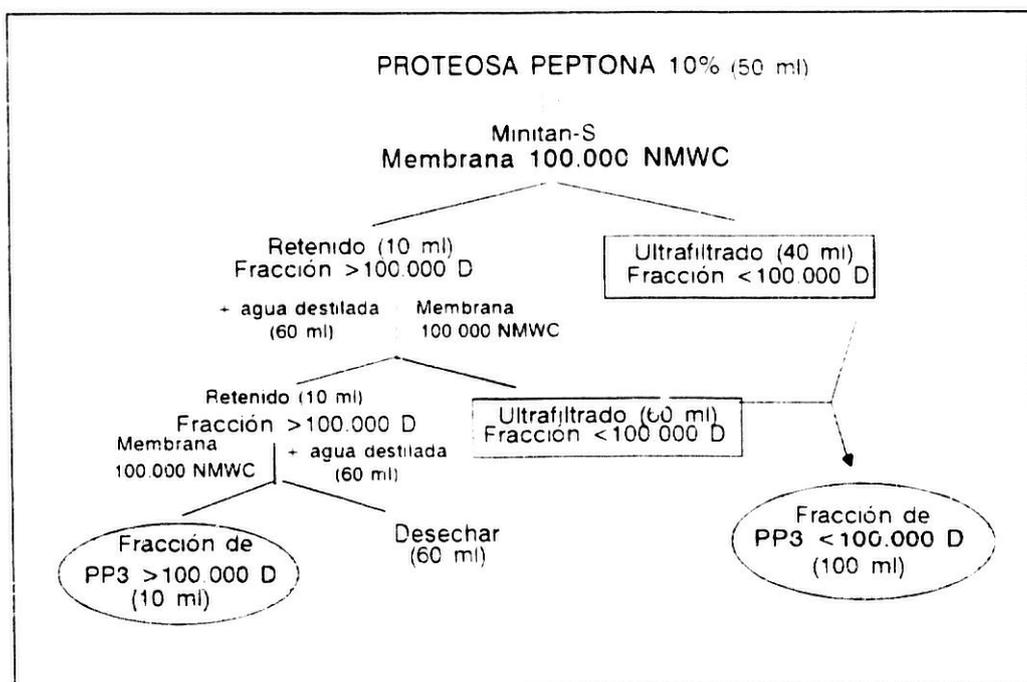


Figura 1. Esquema de Ultrafiltración de Proteosa Peptona N°3 (I)

Mediante el organigrama de la Figura II, hemos conseguido obtener fracciones de Proteosa Peptona con un peso molecular teórico mayor y menor de 10.000 daltons así como una fracción teórica menor de 1.000 daltons y una fracción capaz de atravesar una membrana de NMWC 10.000 pero que queda retenida cuando se emplea una membrana de NMWC 1.000.

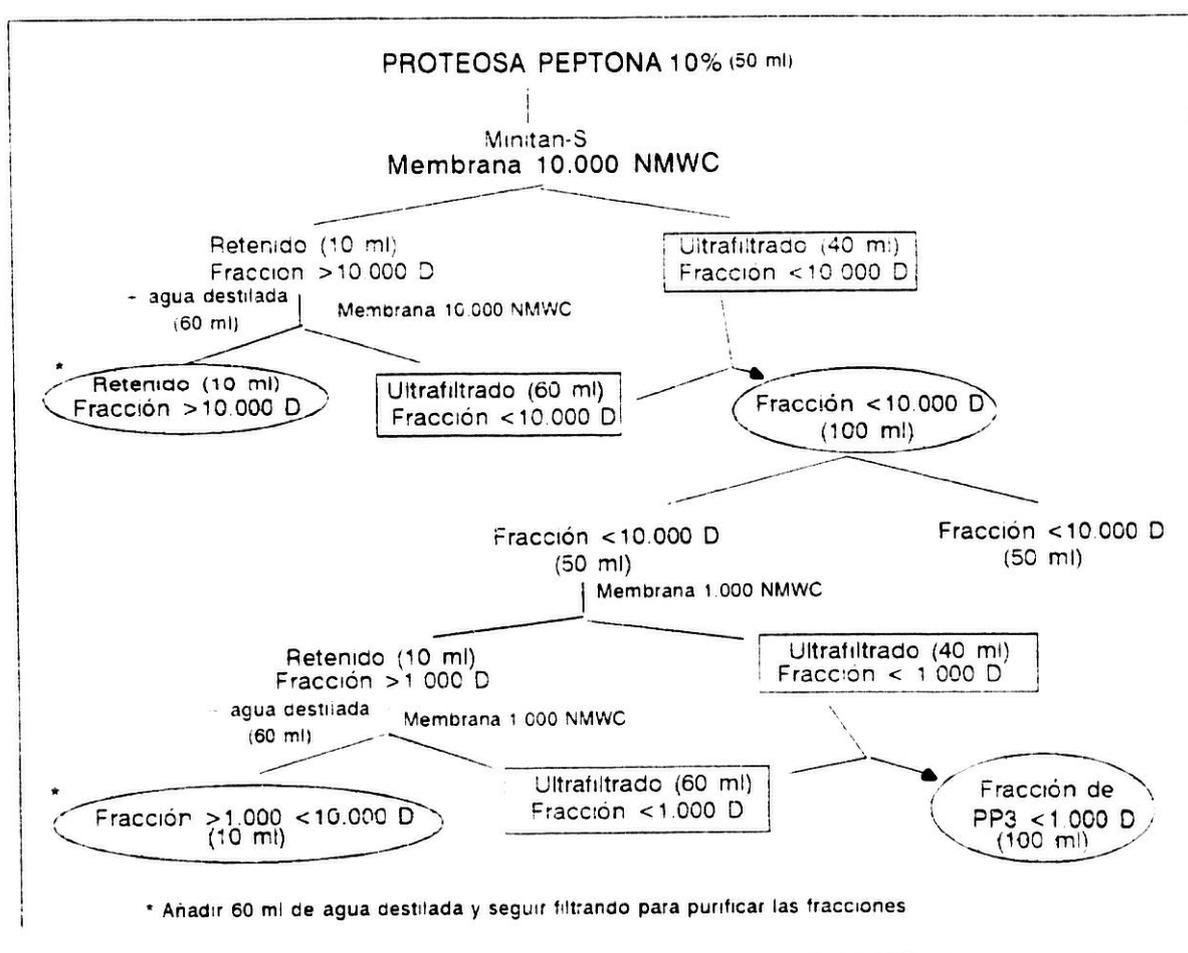


Figura II. Esquema de Ultrafiltración de Proteosa Peptona N°3 (II)

La actividad de las distintas fracciones (ultrafiltrados y retenidos), se comprobó únicamente utilizando el modelo experimental de placas con pocillos, incorporando 100 μ l de cada una de las siguientes fracciones:

- * Fracción retenida (Membrana NMWC 100.000)
- * Ultrafiltrado (Membrana NMWC 100.000)
- * Fracción retenida (Membrana NMWC 10.000)
- * Ultrafiltrado (Membrana NMWC 10.000)
- * Ultrafiltrado (Membrana NMWC 1.000)
- * Ultrafiltrado (Membrana NMWC 10.000) y retenido (Membrana NMWC 1.000)

Hidrólisis enzimática

Hemos seguido el procedimiento de hidrólisis descrito en las figuras III y IV para la digestión de Proteosa Peptona N°3 con los enzimas Tripsina y Pepsina.

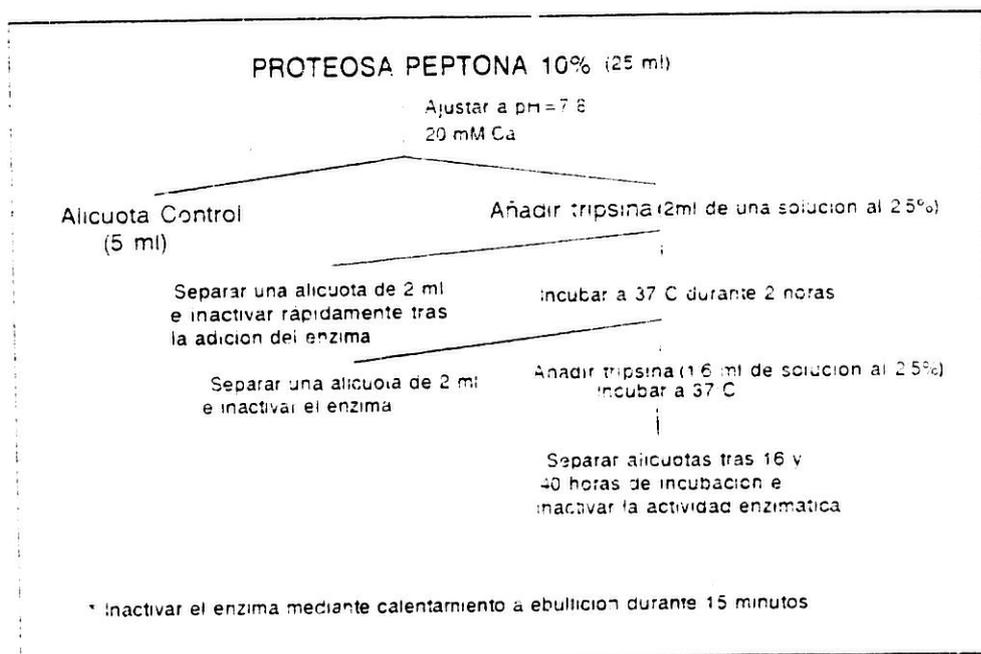


Figura III. Procedimiento de hidrólisis de Proteosa Peptona N°3 con Tripsina

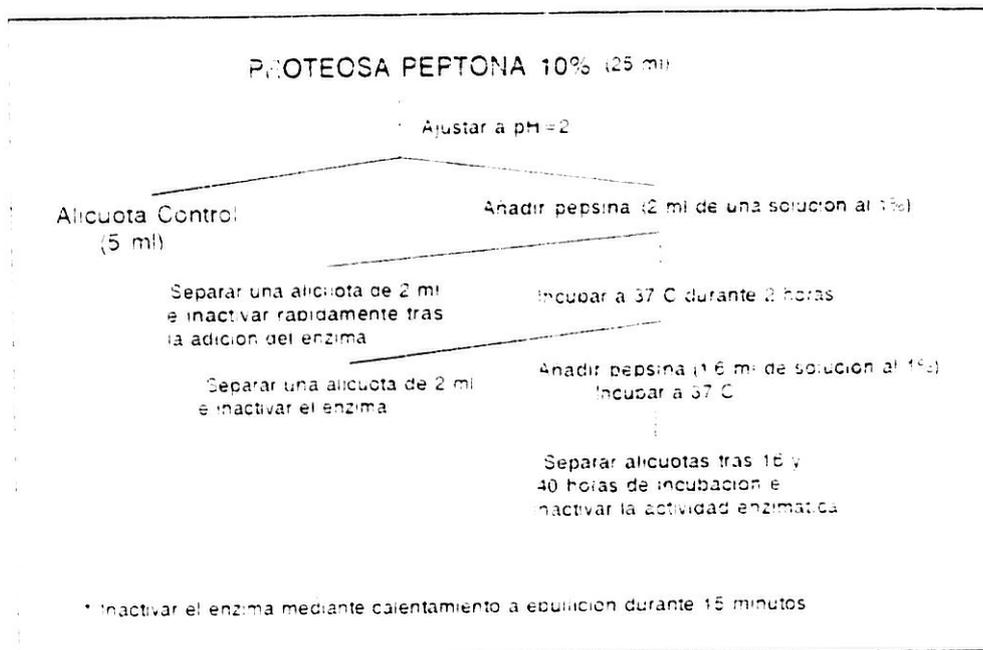


Figura IV. Procedimiento de hidrólisis de Proteosa Peptona N^o3 con Pepsina

Soluciones al 10% de PP3, se sometieron a la acción de los enzimas Tripsina (0152-15-9 Difco) y Pepsina (P-7000 Sigma) en sus debidas condiciones de actuación (pH = 7.8 y adición de 20mM Ca²⁺ en tripsina, con la finalidad de retardar la autólisis del enzima y pH = 2 para el enzima pepsina) (Bridson, 1978).

Tras la adición del enzima, y con la finalidad de comprobar si su incorporación interfiere en la actividad de los hidrolizados obtenidos mediante su acción, se separó una alícuota de la solución de PP3, inactivándose rápidamente la actividad enzimática mediante calentamiento de ésta a ebullición durante 15 minutos (Meynell and Meynell, 1970). Posteriormente, se tomó una alícuota del hidrolizado tras 2 horas de actividad enzimática y se volvió a añadir enzima, dada su gran tendencia a la autólisis (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970). Tras la incubación se tomaron nuevamente alícuotas a diferentes tiempos de actuación de los enzimas (16 y 40 horas) parando el proceso de digestión en ambos casos por calentamiento a ebullición durante 15 minutos (Meynell and Meynell, 1970) y determinando la actividad de los hidrolizados obtenidos, mediante bioautografía

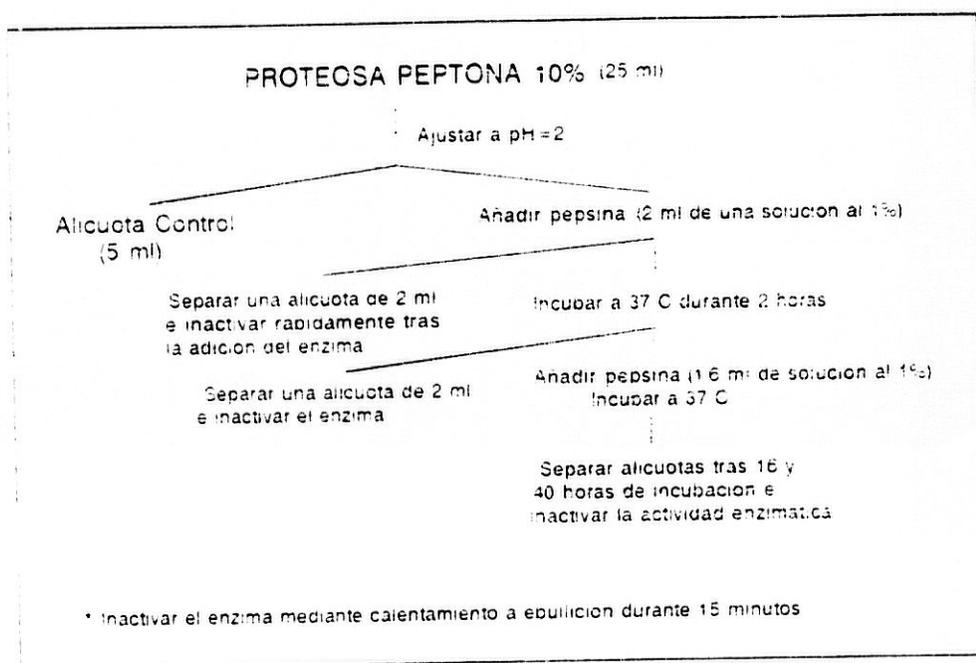


Figura IV. Procedimiento de hidrólisis de Proteosa Peptona N°3 con Pepsina

Soluciones al 10% de PP3, se sometieron a la acción de los enzimas Tripsina (0152-15-9 Difco) y Pepsina (P-7000 Sigma) en sus debidas condiciones de actuación (pH =7.8 y adición de 20mM Ca^{2+} en tripsina, con la finalidad de retardar la autólisis del enzima y pH =2 para el enzima pepsina) (Bridson, 1978).

Tras la adición del enzima, y con la finalidad de comprobar si su incorporación interfiere en la actividad de los hidrolizados obtenidos mediante su acción, se separó una alícuota de la solución de PP3, inactivándose rápidamente la actividad enzimática mediante calentamiento de ésta a ebullición durante 15 minutos (Meynell and Meynell, 1970). Posteriormente, se tomó una alícuota del hidrolizado tras 2 horas de actividad enzimática y se volvió a añadir enzima, dada su gran tendencia a la autólisis (Bridson, 1978; Bridson and Brecker, 1970). Tras la incubación se tomaron nuevamente alícuotas a diferentes tiempos de actuación de los enzimas (16 y 40 horas) parando el proceso de digestión en ambos casos por calentamiento a ebullición durante 15 minutos (Meynell and Meynell, 1970) y determinando la actividad de los hidrolizados obtenidos, mediante bioautografía

(100 μ l). La digestión se siguió hasta que no se detectaron proteosas mediante reacción con una solución saturada de ZnSO₄ (40 horas) (Bridson, 1978).

Como controles de actividad, hemos utilizado en el caso de la hidrólisis con tripsina, una solución de Proteosa Peptona N°3 al 10%, PP3 al 10% pH = 7.8 y 20 mM Ca²⁺, PP3 adicionada de tripsina e inactivada la actividad de ésta rápidamente por calentamiento a ebullición (Meynell and Meynell, 1970) y la solución de tripsina utilizada en el proceso hidrolítico. La cantidad de enzima adicionada cada vez ha sido 1 ml de solución al 2,5% de tripsina por cada 10 ml de PP3 al 10%.

En el caso de hidrólisis con el enzima pepsina, hemos utilizado PP3 al 10%, PP3 a pH=2, necesario para la actividad enzimática obtenido mediante la adición de ClH, PP3 adicionada de pepsina e inactivada la actividad de ésta rápidamente por calentamiento a ebullición y la solución de pepsina (solución al 1%) empleada para la hidrólisis. Igual que en la hidrólisis con tripsina la cantidad de enzima adicionada fué de 1 ml de la solución al 1% por cada 10 ml de PP3.

3.5.3. Actividad de otros hidrolizados proteicos sobre la pigmentación de *S. agalactiae*

Se estudió la actividad biológica de los siguientes hidrolizados proteicos:

Proteosa Peptona N°2	0121-01 Difco
Proteosa Peptona	0120-01 Difco
Proteosa Peptona	L 46 Oxoid
Peptona (Eacto).....	0118-01-8 Difco
Peptamina (Bacto)	0905-01 Difco
Triptona (Bacto)	0123-01 Difco
Triptosa	L 47 Oxoid
Hidrolizado de lactoalbúmina	L 46 Oxoid
Lab-Lemco	L 49 Oxoid

Cas-aminoácidos 0230-01 Difco
Cas-aminoácidos sin Vitaminas .. 0288-02-1 Difco

Para ello, se utilizó:

a) La incorporación a una concentración del 2,5% de estos análogos de PP3 al Medio Base en el que se ha eliminado la Proteosa Peptona, utilizando medios en placa y en tubo.

b) La adición de un volumen de 100 μ l de soluciones de diferentes concentraciones de los diversos hidrolizados (20%, 10%, 5%, 2'5%, 1'25%) a pocillos con los medios de cultivo utilizados como modelo experimental.

3.5.4. Actividad de Acidos Nucleicos sobre la pigmentación de EGB

Los mononucleótidos o nucleósidos de bases púricas y pirimidínicas se obtienen rápidamente por calentamiento a ebullición de soluciones de éstos en NaOH 0,1N a 100°C durante 2,5 horas (Meynell and Meynell, 1970); por ello, además de las soluciones acuosas del ácido ribonucleico de *Torula* (R-6625 Sigma) y del ácido desoxirribonucleico (3231-12-1 Difco), hemos determinado las actividades biológicas de los hidrolizados obtenidos en las condiciones anteriores tomando como partida soluciones al 0,5% y 1% de estos ácidos nucleicos e incorporando 50 μ l de cada uno de ellos a pocillos realizados en placas con los 3 medios de cultivo utilizados como modelo experimental (Método bioautográfico).

3.5.5. Actividad de Vitaminas sobre la formación de pigmento por EGB

Hemos determinado la actividad de mezclas de vitaminas así como de vitaminas individuales, utilizando el modelo de placas con pocillos (Modelo bioautográfico) e incorporando 100 μ l de cada una de ellas a los 3 medios de cultivo empleados como modelo experimental (Ver 3.5.1.).

A continuación mencionamos, las vitaminas utilizadas individualmente y la composición de las mezclas ensayadas.

* Concentrado de vitaminas para Medio basal de Eagle Modificado (100X)
(16-004-49 Laboratorios Flow)

La composición y concentración de éste es la siguiente:

Biotina	0'1 g/l
Pantotenato cálcico	0'1 g/l
Cloruro de colina	0'1 g/l
i-inositol	0'2 g/l
Acido fólico	0'1 g/l
Nicotinamida	0'1 g/l
Piridoxal	0'1 g/l
Riboflavina	0,01 g/l
Tiamina (clorhidrato)	0'1 g/l

* Concentrado de vitaminas sin tiamina, igual composición que el concentrado comercial (Laboratorios Flow), diferenciándose únicamente en la eliminación de esta vitamina.

* Soluciones de vitaminas individuales incluídas en el concentrado y a la misma concentración de éste.

d-Biotina (vitamina H)	B-4501 Sigma
Pantotenato cálcico	P-2250 Sigma
Cloruro de colina	C-7017 Sigma
Acido fólico	F-7876 Sigma
myo-inositol	4728 Merck
Niacinamida	N-3376 Sigma
Piridoxal (clorhidrato)	P-9130 Sigma
Riboflavina	R-4500 Sigma
Tiamina (clorhidrato)	T-4625 Sigma

Se prepararon soluciones de cada una de las vitaminas mencionadas en agua, excepto en el caso de riboflavina que se disolvió en ácido acético 0,02 N y el ácido fólico en NaOH 0,01 N (Meynell and Meynell, 1970; Bridson, 1978).

3.5.6. Actividad de Aminoácidos en la producción de pigmento por *S. agalactiae*

Hemos determinado la actividad sobre la pigmentación de EGB, de una mezcla de aminoácidos y de sus constituyentes individuales, del mismo modo descrito en 3.5.5.

Hemos ensayado:

* Concentrado de aminoácidos no esenciales (100X) para MEM de Eagle (16-810-49 Laboratorios Flow).

La composición de éste es la siguiente:

L-alanina	0'89 g/l
L-asparagina	1'5 g/l
Acido L-aspártico .	1'33 g/l
Glicina	0'75 g/l
Acido L-glutámico.	1'47 g/l
L-prolina	1'15 g/l
L-serina	1'05 g/l

* Concentrado de aminoácidos esenciales sin L-glutamina (50X) para MEM de Eagle (16-011-49 Laboratorios Flow).

Contiene los siguientes aminoácidos a las concentraciones de:

L- arginina (clorhidrato) ...	6'32 g/l
L-cistina disódica	1'42 g/l
L-histidina (clorhidrato) ...	2'1 g/l
L-iso-leucina	2'63 g/l

L-leucina	2'63 g/l
L-lisina (clorhidrato)	3'65 g/l
L-metionina	0'75 g/l
L-fenilalanina	1'65 g/l
L-treonina	2'38 g/l
L-triptófano	0'51 g/l
L-tirosina disódica	2'25 g/l
L-valina	2'35 g/l

* Concentrado de aminoácidos esenciales sin triptófano y sin L-glutamina, preparado a las mismas concentraciones del anterior eliminando los 2 aminoácidos citados.

* Soluciones individuales de los aminoácidos esenciales incluidos en el concentrado anterior a igual concentración que en éste.

L-arginina	1542 Merck
L-cistina	0184-13 Difco
L-histidina	H-8125 Sigma
L-iso-leucina	I-2752 Sigma
L-leucina	L-8000 Sigma
L-lisina (monohidrato) ...	5700 Merck
L-metionina	M-9625 Sigma
L-fenilalanina	P-2126 Sigma
L-treonina	T-8625 Sigma
L-triptófano	T-0254 Sigma
L-tirosina	8371 Merck
L-valina	V-0500 Sigma

Para la preparación de las soluciones, se disolvieron los aminoácidos en agua, excepto cistina y triptófano que se han disuelto en ClH 0,2 N y tirosina en NaOH 0,2 N (Meynell and Meynell, 1970; Bridson, 1978).

3.5.7. Actividad del Extracto de Levadura sobre la formación de pigmento por *S. agalactiae*.

Se han elaborado medios en placa y en tubo, tomando como partida el Medio Base e incorporando Extracto de levadura en sustitución de Proteosa Peptona N°3 (PP3) a una concentración final del 2,5%. Así mismo, se ha determinado su actividad sobre la pigmentación de EGB siguiendo la técnica bioautográfica ya descrita (Ver 3.5.1.).

Diálisis de Extracto de Levadura

Se procedió del mismo modo, que para la obtención de dializados de PP3, partiendo de una solución de Extracto de levadura al 10% (Ver 3.5.2.) e inoculando 100 μ l tanto de la fracción retenida como del dializado en pocillos de los medios de cultivo empleados como modelo experimental.

Ultrafiltración de Extracto de Levadura

Las fracciones de Extracto de levadura con pesos moleculares teóricos > 10.000 , < 10.000 , < 10.000 y > 1.000 y < 1.000 daltons, se obtuvieron de forma semejante a las de Proteosa Peptona, determinándose su actividad biológica en el modelo de placas con pocillos descrito en el estudio de ésta (Ver 3.5.2.).

Hidrólisis enzimática

El procedimiento seguido para la hidrólisis del Extracto de levadura es el mismo que el mencionado para Proteosa Peptona (Ver 3.5.2.); no obstante, en este caso se han ensayado únicamente los hidrolizados obtenidos tras 40 horas de

actuación de los enzimas Pepsina y Tripsina y no a diferentes tiempos de la hidrólisis enzimática como en el caso de Proteosa Peptona.

Actividad de Extracto de Levadura (autoclavado)

Con el propósito de destruir la tiamina presente en el Extracto de Levadura, se preparó una solución de este hidrolizado al 10% en agua, y se adicionó la suficiente cantidad de NaOH hasta conseguir un pH=11, autoclavando a 120°C durante 15 minutos (Litter, 1984).

Mediante bioautografía, se determinó la actividad de la solución autoclavada a pH alcalino (previo ajuste de ésta a su pH inicial) junto a la de una solución autoclavada sin modificación del pH.

3.6. ESTUDIO DE SUERO COMO CONSTITUYENTE DEL MEDIO BASE

3.6.1. Modelo experimental

Medio de cultivo

Hemos utilizado 2 medios de cultivo especialmente diseñados para el estudio de componentes que puedan actuar (cuando se incorporan en sustitución del suero de caballo), bien ejerciendo un efecto activador en la producción del pigmento o bien no modificando e incluso inhibiendo su formación.

* Medio Base eliminando Metotrexato y suero (MB sin MTX sin Suero).

* Medio Base eliminando únicamente el suero (MB sin Suero).

Métodica de trabajo

Del mismo modo, que en el estudio de Almidón y Proteosa Peptona, se han seguido dos esquemas de trabajo:

Modelo experimental (Placa-Tubo): El Medio Base sin suero de caballo, se suplementó con la cantidad necesaria de otros componentes para obtener una concentración final en el medio del 5%, concentración a la que se utiliza el Suero de caballo en éste.

Modelo experimental de placas con pocillos (Método bioautográfico): Siguiendo la técnica descrita en el estudio de Almidón y Proteosa Peptona (3.4.1 y 3.5.1.), se adicionaron alicuotas de cada uno de los componentes a ensayar a pocillos realizados en los dos medios (Medio Base sin Metotrexato sin Suero) y (Medio Base sin Suero).

En ambos modelos experimentales, el inóculo bacteriano, condiciones de incubación y lectura e interpretación de los resultados son los mismos que los establecidos en Almidón y Proteosa Peptona (Ver 3.4.1. y 3.5.1.).

3.6.2. Actividad de Suero de caballo (SR-35 Oxoid) sobre la pigmentación de *S.agalactiae*

Medios en placas y tubos adicionados de un 5% de suero de caballo así como medios carentes de éste, nos han permitido evaluar la influencia de la adición de este componente sobre la pigmentación de *S.agalactiae* (Ver 3.3.2.).

Con el propósito de conocer la concentración de suero hasta la cual es posible conseguir una potenciación del pigmento, hemos determinado el contenido proteico total del suero de caballo y posteriormente ajustado éste a una concentración proteica del 1%, 0,5%, 0,25% y 0,12%, (utilizando un procedimiento comercial -Protein Assay Reagent BCA Pierce- que combina la clásica reacción del Biuret con un reactivo altamente selectivo para la detección de Cu^{1+} , el ácido bicínico,

siguiendo el protocolo estándar descrito por el fabricante), incorporando 100 μ l de suero a cada una de las concentraciones detalladas a pocillos de los dos medios de cultivo empleados como modelo experimental (Medio Base sin MTX sin Suero y MB sin Suero).

3.6.3. Actividad del plasma humano, sueros de diferentes procedencias y fracciones de éste sobre la producción de pigmento por *S.agalactiae*.

La actividad del plasma humano (procedente de Banco de sangre) y de distintos sueros, entre ellos suero vacuno, suero ovino (suministrados por BioMedics), suero humano (pool de sueros de donantes voluntarios), suero de conejo (Difco) y suero fetal bovino (JVK Kraeber GMBM&CO), se determinó utilizando ambos modelos experimentales (Modelo placa-tubo y Modelo de placas con pocillos), como hemos descrito en 3.6.1.

Por otro lado, hemos comparado la actividad de estos sueros con la de suero de caballo, para lo cual los hemos ajustado a una concentración proteica del 1%, 0'5%, 0'25% y 0'12% (Ver 3.6.2.) e incorporado 100 μ l a pocillos realizados en placas de (MB sin Metotrexato y sin Suero) y (MB sin Suero), anotando la presencia o ausencia de potenciación de pigmento alrededor de cada uno de ellos y comparando esta actividad con la observada para el Suero de caballo a la misma concentración.

Las proteínas citadas a continuación, se han utilizado a una concentración del 0,5%, habiéndose incorporado 100 μ l de cada una de ellas a pocillos de medios de cultivo (MB sin Metotrexato sin Suero y MB sin Suero) para determinar su actividad sobre la pigmentación.

<u>Albúminas:</u>	A. bovina (Fracción V)	A-9647 Sigma
	A. humana	860668 Grifols S.A
	A. de huevo	E-0500 Sigma

<u>Globulinas:</u>	Glogama ^R	Llorente
	Gamma-Venin ^R	Behring
	Endobulin ^R	Immuno
	α_2 -macroglobulina	M-7151 Sigma
	Tiroglobulina	T-1001 Sigma
	Trasylol (Aprotinina)	280511 Bayer
	α_1 -Proteasa Inhibidor (Prolastin ^R).....	Bayer

3.6.4. Actividad de Suero humano sobre la pigmentación de *S.agalactiae*.

Ultrafiltración

Hemos estudiado la actividad de las fracciones del suero humano obtenidas mediante ultrafiltración de éste a través de membranas de NMWC 300.000, 100.000, 30.000 y 10.000 sobre la formación de pigmento por EGB.

Obtención de las fracciones

Hemos utilizado unidades de filtración Ultrafree-PF^R (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) con membranas de celulosa regenerada de NMWC 10.000 (UFP 1 LGC 24) y membranas de polisulfona de NMWC 30.000 (UFP 1 TTK 24).

La unidad Ultrafree-PF^R consiste en un cilindro de filtración, un recipiente de recogida de filtrado y una cubierta extraíble. El fundamento de este método de filtración es similar al de la diálisis, no obstante es necesario establecer una diferencia de presión a uno y otro lado de la membrana para suplir la escasa permeabilidad de la misma.

Hemos empleado volúmenes de 2 ml de suero adicionados al cilindro de filtración y sometidos a una presión aproximada de 3 bar mediante la inyección de N₂. Las unidades de ultrafiltración se mantuvieron a una temperatura entre 0-5 °C durante todo el proceso para evitar la contaminación bacteriana.

Para la obtención de las fracciones con peso molecular teórico mayor de 300.000, menor de 300.000 daltons, mayor y menor de 100.000 daltons, hemos utilizado el sistema de filtración tangencial Minitan-S, empleando membranas de polisulfona de NMWC 300.000 (PTMK OMS 10) y de NMWC 100.000 (PTHK OMS 10).

El esquema de trabajo es similar al empleado para Proteosa Peptona (Ver 3.5.2.) y se resume a continuación: 50 ml de suero previamente filtrados mediante filtros de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore), se ultrafiltraron a través de una membrana (NMWC 300.000 o 100.000). Tras obtener 40 ml del ultrafiltrado, se añadió con el fin de obtener retenidos lo más puros posibles agua destilada y se siguió filtrando, hasta alcanzar 100 ml de ultrafiltrado y 10 ml del retenido. Se siguió lavando, mediante la adición de agua destilada la fracción retenida, desechando el ultrafiltrado de este último paso.

Hidrólisis enzimática

La hidrólisis se realizó con los enzimas Tripsina (0152-15-9 Difco) y Pepsina (P-7000 Sigma), siguiendo los esquemas de actuación reflejados a continuación.

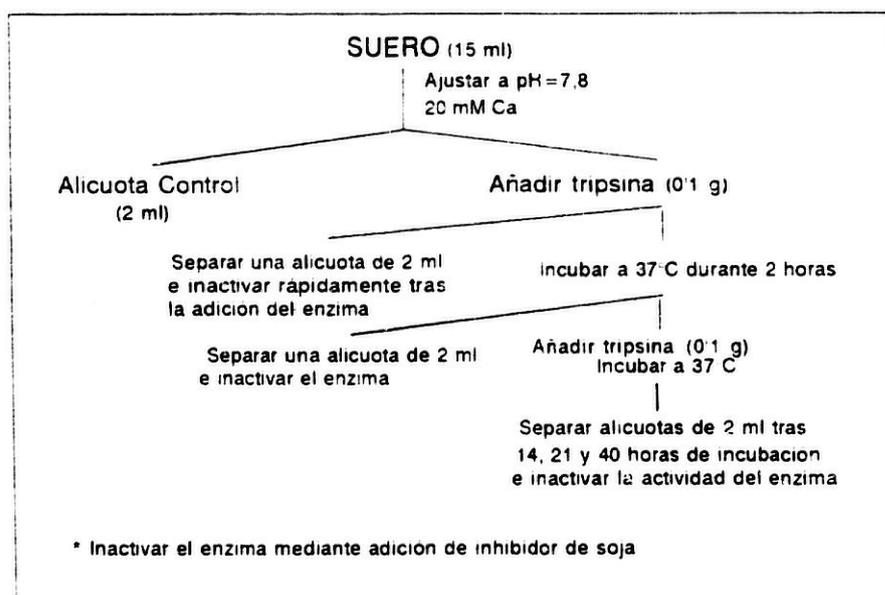


Figura V. Procedimiento de Hidrólisis del suero con Tripsina

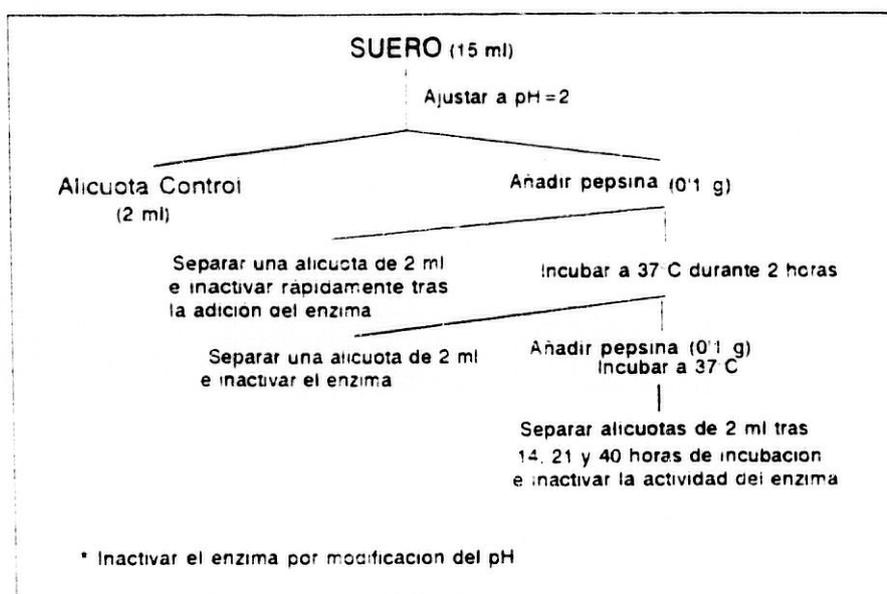


Figura VI. Procedimiento de Hidrólisis del suero con Pepsina

Antes de la adición del enzima, se ajustó el pH del suero al pH de la actividad enzimática (pH = 7,8 para tripsina y pH = 2 en pepsina) mediante la adición de NaOH en el primer caso y ClH en el segundo; en el caso de tripsina se hizo el suero 20mM Ca^{2+} , mediante la adición de Cl_2Ca .

Inicialmente se adicionó enzima en exceso (0.1 g) separándose una alícuota e inactivando rápidamente el enzima de ésta. Tras una incubación de 2 horas a 37°C se separó una alícuota del hidrolizado inactivándose la actividad enzimática, como se detalla seguidamente y debido a la posible autólisis del enzima se volvió a añadir la misma cantidad de enzima procediéndose de nuevo a la incubación a 37°C. Se tomaron alícuotas de suero sometidas a la hidrólisis enzimática a diferentes tiempos de actuación del enzima (14 h, 21 h y 40 horas), se inactivaron por cambio de pH en el caso de hidrólisis con pepsina (el pH de actuación del enzima es 2 y el pH del suero aproximadamente 7) y por adición de la cantidad necesaria de inhibidor de tripsina obtenido de soja (Sigma T-9128) en el caso de este enzima.

Los hidrolizados pépticos y trípticos a diferentes tiempos de actuación del enzima se ensayaron en placas con pocillos (100 μ l), incluyéndose como controles: suero a pH = 2 (pH de actuación de pepsina) y después ajustado a su pH inicial, suero a pH = 7,8 y 20 mM Ca^{2+} (pH de actuación de tripsina), suero adicionado de inhibidor de soja y las disoluciones de trabajo de tripsina y de pepsina.

Diálisis

Se dializó un volumen de 50 ml de suero humano frente a igual volumen de tampón fosfato 0,15 M pH = 7,4 durante aproximadamente 24 horas, determinándose mediante bioautografía la actividad biológica de ambas fracciones (retenida en la membrana y dializado) tras su incorporación a pocillos (100 μ l).

Coagulación de suero y actividad de los sobrenadantes

Aproximadamente un volumen de 50 ml de suero se calentó en bañomaria a ebullición durante 15 minutos. Tras su coagulación se agitó mediante Vortex, se centrifugó y el sobrenadante obtenido tras este proceso (100 μ l) se incorporó a pocillos de los medios de cultivo utilizados como modelo experimental.

Fraccionamiento del suero mediante precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

Obtención de las fracciones

Partimos de suero diluído a la mitad (50 ml suero + 50 ml agua destilada) previamente dializado frente a tampón fosfato 0,15 M pH = 7,4 y filtrado mediante filtros de 0,45 μ m (Millipore).

Se hicieron alicuotas de 20 ml de suero, a las que se añadió poco a poco y agitando continuamente la cantidad necesaria de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ para obtener un 20, 30, 40 y 50% de saturación. Posteriormente, se ajustó el pH a 7,4 y se dejó sedimentar durante toda la noche a 4°C. Pasado este tiempo, se centrifugó a 3.000 g durante 40 minutos, decantándose los sobrenadantes. Los precipitados se lavaron con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a la misma concentración empleada para precipitarlos, se redisolieron en buffer fosfato 0,15 M pH=7,4 y se volvieron a centrifugar a 3000 g durante 15 minutos para separar totalmente cualquier materia insoluble (Harris, 1989).

Mediante bioautografía, se determinó la actividad de sobrenadantes y sedimentos obtenidos tras el fraccionamiento con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, incorporando 100 μl de cada uno de ellos así como las soluciones de trabajo de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ utilizadas en la precipitación.

3.6.5. Actividad de Líquidos orgánicos sobre la formación de pigmento por EGB

Hemos determinado mediante el modelo de placas con pocillos (adicionando 100 μl a cada uno de ellos) la actividad biológica de 50 fluidos orgánicos entre los que se han incluido (10 líquidos pleurales, 7 líquidos articulares, 8 líquidos ascíticos, 15 líquidos de diálisis peritoneal y 10 líquidos cefalorraquídeos).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. EXPERIENCIAS PRELIMINARES

4.1.1. Condiciones de incubación

Los resultados expuestos en la Tabla VIII, reflejan una mayor intensidad del pigmento en la superficie de placas del Medio Base (MB) a medida que la atmósfera de incubación se hace más anaerobia.

Tabla VIII. Efecto de diferentes atmósferas de incubación en la formación de pigmento por *S. agalactiae* en el Medio Base* (Cultivo en placas).

Atmósfera de incubación	PIGMENTO			
	Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
Aerobia	Naranja-amarillento(+)	Naranja-amarillento(+)	Naranja-amarillento(+)	Naranja-amarillento(+)
5% CO ₂	Naranja-amarillento(+)	Naranja-amarillento(+)	Naranja claro(++)	Naranja claro(++)
Microaerófila (5% O ₂)	Naranja-amarillento(+)	Naranja claro(++)	Naranja claro(++)	Naranja claro(++)
Anaerobia	Naranja claro(++)	Naranja intenso(+++)	Naranja intenso(+++)	Naranja intenso(+++)

Medio Base*: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

En medios sembrados en profundidad, observamos que la pigmentación es similar en todas las atmósferas de incubación (Tabla IX), sin existir diferencias de intensidad en el interior del medio de cultivo en función de su proximidad a la superficie.

Tabla IX. Efecto de diferentes atmósferas de incubación en la formación de pigmento por *S. agalactiae* en el Medio Base' (Cultivo en tubos).

Atmósfera de incubación	PIGMENTO			
	Cepa I	Cepa II	Cepa III	Cepa IV
Aerobia	Naranja claro (++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)
5% CO ₂	Naranja claro (++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)
Microaerófila (5% O ₂)	Naranja claro (++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)
Anaerobia	Naranja claro (++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)	Naranja intenso (+++)

Medio Base': 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

4.1.2. Influencia de la composición del medio de cultivo en la formación de pigmento por *Streptococcus agalactiae*.

Los resultados expuestos en la Tabla X, son comunes a las 4 cepas de EGB estudiadas, excepto para medios sembrados en profundidad donde no se adiciona suero de caballo en los que existe variabilidad en la intensidad de pigmento dependiendo de la cepa; concretamente en la cepa I, se observa menor pigmentación cuando no se incorpora este componente (Figura VII). Sin embargo, la eliminación de suero de caballo en medios sembrados en superficie no afecta a la intensidad de la pigmentación.

Observamos también en la Tabla X, que la ausencia de Proteosa Peptona en el medio de cultivo se traduce en falta de crecimiento del microorganismo.

En el Medio Base (MB) sin fosfatos aún manteniéndose el crecimiento normal de las cepas de EGB, no se observa pigmento en ninguna de ellas.

Un hecho similar al de los fosfatos ocurre en el MB carente de almidón, aunque en este caso aparece una pigmentación colonial ligeramente amarillenta en la superficie de las placas, no observándose pigmento en medios sembrados en profundidad (Tabla X y Figura VII).

En medios que no incorporan metotrexato en su formulación, EGB es capaz de producir pigmento en placa y en tubo, pero de color naranja más débil que en sus homólogos de igual composición que sí lo incluyen.

La eliminación de los demás componentes del medio de cultivo (piruvato sódico, MOPS, glucosa y sulfato de Magnesio) no afecta significativamente a la formación y visualización del pigmento producido por el microorganismo.

Tabla X. Pigmentación producida por EGB en diferentes medios de cultivo

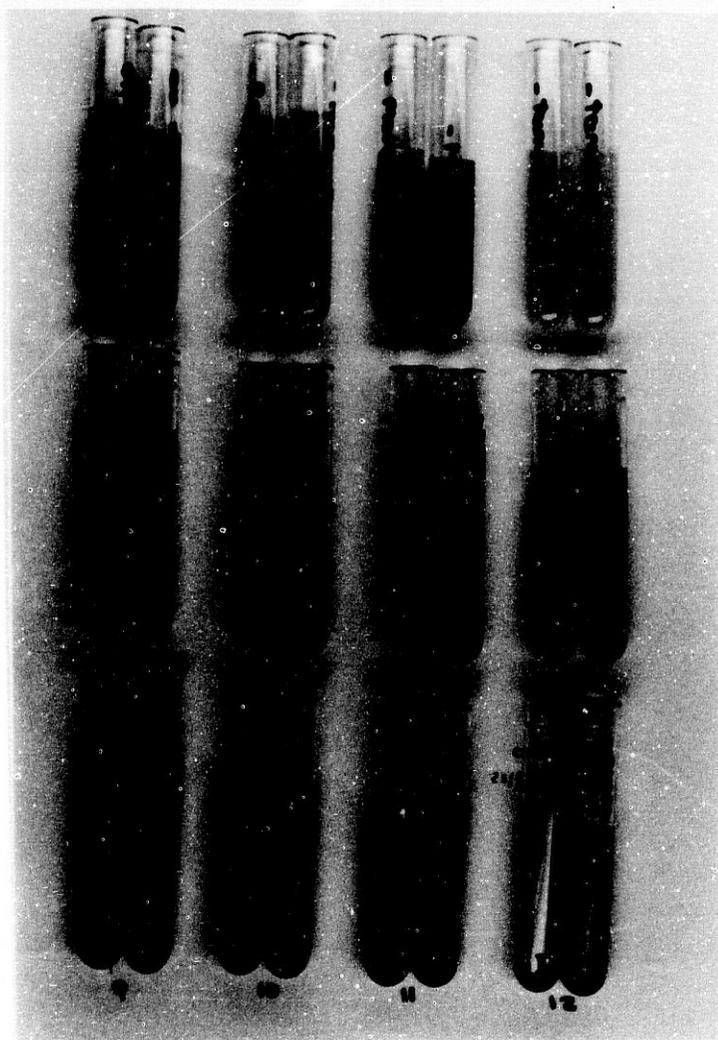
MEDIO DE CULTIVO	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
Medio Base [§]	Naranja intenso (+++)	
MB sin PP N°3	No crecimiento	
MB sin Almidón	Naranja-amarillento(+)	No pigmento
MB sin Metotrexato	Naranja claro (++)	
MB sin Suero	Naranja intenso (+++)	Variable [§]
MB sin Na ₂ PO ₄ H	No pigmento	
MB sin MOPS	Naranja intenso (+++)	
MB sin Piruvato sódico	Naranja intenso (+++)	
MB sin Glucosa	Naranja intenso (+++)	
MB sin MgSO ₄	Naranja intenso (+++)	

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

§: Intensidad de pigmento variable (+++, ++) de una cepa a otra.

En la figura VII, presentamos la pigmentación obtenida para las cepas I y II de EGB en diversos medios de cultivo.

Figura VII. Pigmentación producida por *S.agalactiae* en medios de cultivo que eliminan algún componente del Medio Base (Cultivo en tubos).



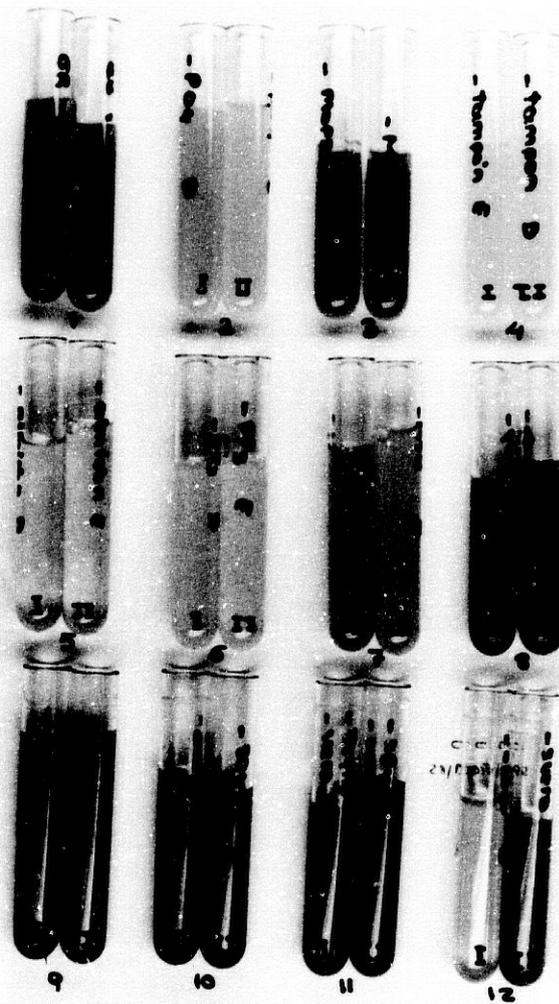
Medio Base (MB): 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato y 1% agar.

Medios: 1. Medio Base 2. MB sin $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 3. MB sin MOPS (sal sódica) 4. MB sin tampón ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ + MOPS)
5. MB sin almidón 6. MB sin Proteosa Peptona 7. MB sin metotrexato 8. MB sin glucosa 9. MB sin piruvato sódico 10. MB sin Sulfato de Magnesio 11. MB sin Sulfato de Magnesio y sin Suero 12. MB sin Suero de caballo.

I y II: Cepas bacterianas

En la figura VII. presentamos la pigmentación obtenida para las cepas I y II de EGB en diversos medios de cultivo.

Figura VII. Pigmentación producida por *S. agalactiae* en medios de cultivo que eliminan algún componente del Medio Base (Cultivo en tubos).



Medio Base (MB): 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato y 1% agar.

Medios: 1. Medio Base 2. MB sin $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ 3. MB sin MOPS (sal sódica) 4. MB sin tampón ($\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ + MOPS)
5. MB sin almidón 6. MB sin Proteosa Peptona 7. MB sin metotrexato 8. MB sin glucosa 9. MB sin piruvato sódico 10. MB sin Sulfato de Magnesio 11. MB sin Sulfato de Magnesio y sin Suero 12. MB sin Suero de caballo.

I y II: Cepas bacterianas

En la tabla XI y figuras VIII, IX, observamos cómo la detección del pigmento de EGB, varía de unos medios de cultivo a otros dependiendo de la formulación utilizada y del método de siembra (superficie-placa o sobrefusión-tubo).

Tabla XI. Pigmentación producida por EGB en variantes del Medio Base

	MEDIOS DE CULTIVO	PIGMENTO	
		Placa	Tubo
Nº1	-A-MTX-S	No pigmento	
Nº2	-A-MTX	No pigmento	
Nº3	-MTX-S	Naranja claro (++)	
Nº4	-MTX	Naranja claro (++)	
Nº5	-A-S	Naranja-amarillento(+)	No pigmento
Nº6 ^a	-A	Naranja-amarillento(+)	No pigmento
Nº7	-S	Naranja intenso(+++)	Variable ^s
Nº8 ^a	MEDIO BASE	Naranja intenso (++++)	
Nº9	-PP-MTX-S	No crecimiento	
Nº10	-PP-MTX	No crecimiento	
Nº11	-PP-S	No crecimiento	
Nº12	-PP	No crecimiento	

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

PP: Proteosa Peptona n°3 (Difco); A: Almidón soluble (Merck 1252); MTX: metotrexato (Lederle); S: suero de caballo.

Variable^s: intensidad de pigmento variable de una cepa a otra; &: Con/sin Glucosa.

Todos los medios enumerados son modificaciones del Medio Base por eliminación de los componentes precedidos por el signo -.

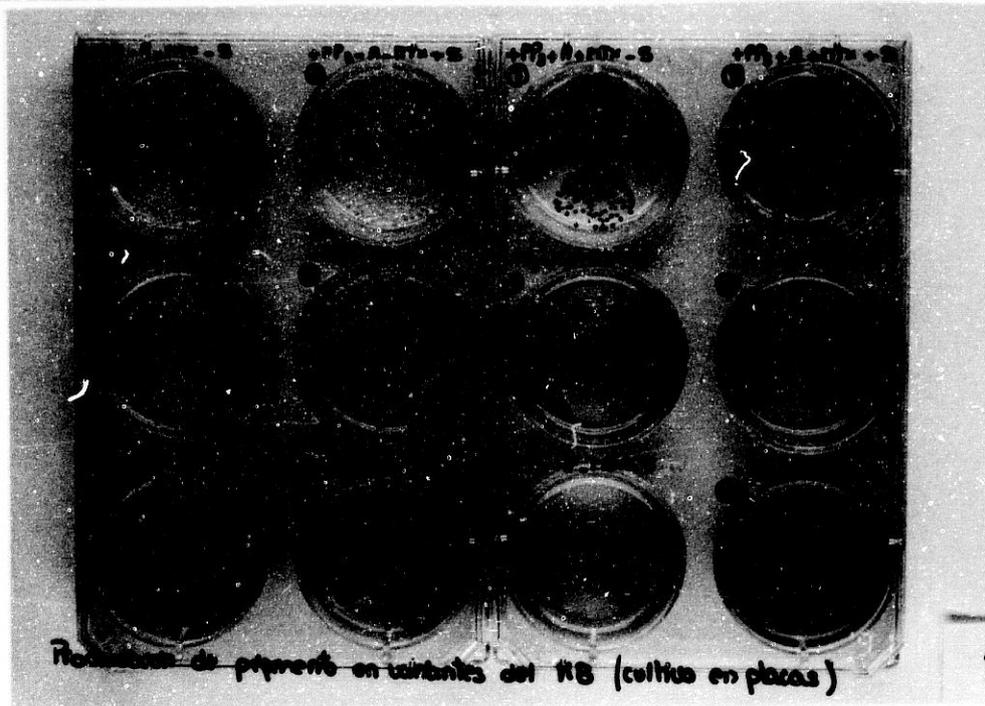
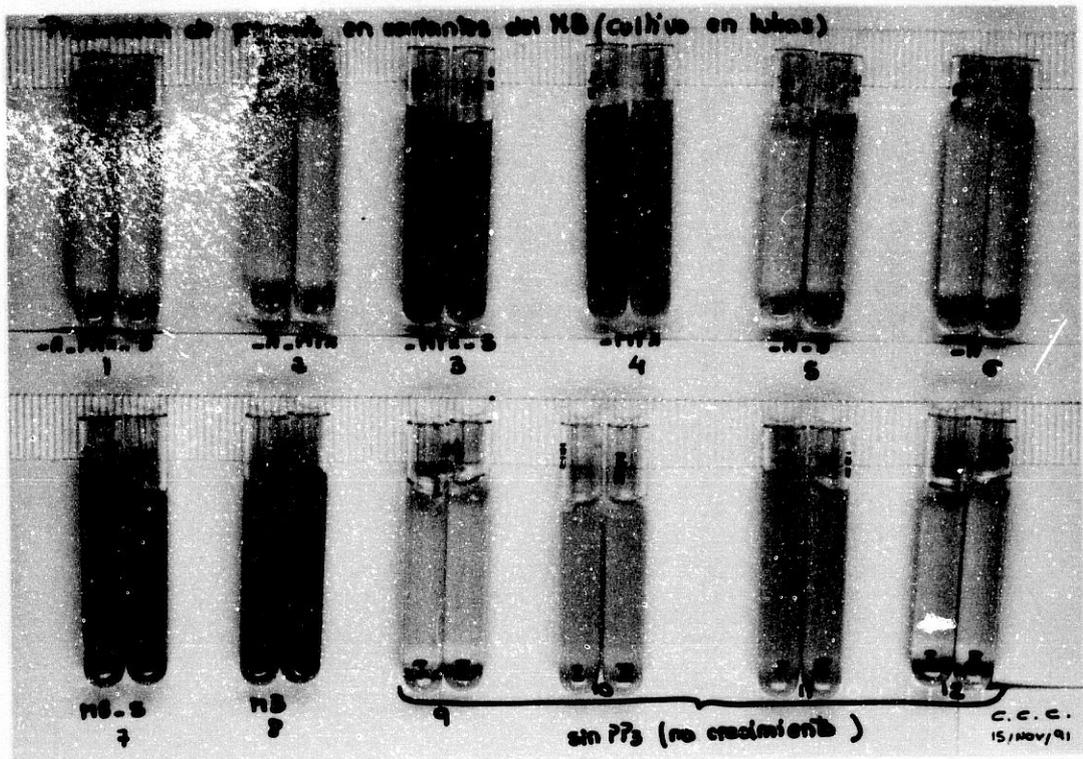


Figura IX y X. Pigmentación producida por EGB en variantes del Medio Base (Cultivo en tubos y en placas)

PP3: Proteosa Peptona N°3; A: almidón; MTX: metotrexato; S: suero de caballo; I, II: Cepas bacterianas.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato y 1% agar.

Medios: 1. MB sin Almidón, sin MTX, sin Suero 2. MB sin Almidón, sin MTX 3. MB sin MTX, sin Suero 4. MB sin MTX 5. MB sin Almidón, sin Suero 6. MB sin Almidón 7. MB sin Suero 8. MEDIO BASE 9. MB sin PP3, sin MTX, sin Suero 10. MB sin PP3, sin MTX 11. MB sin PP3, sin Suero 12. MB sin PP3

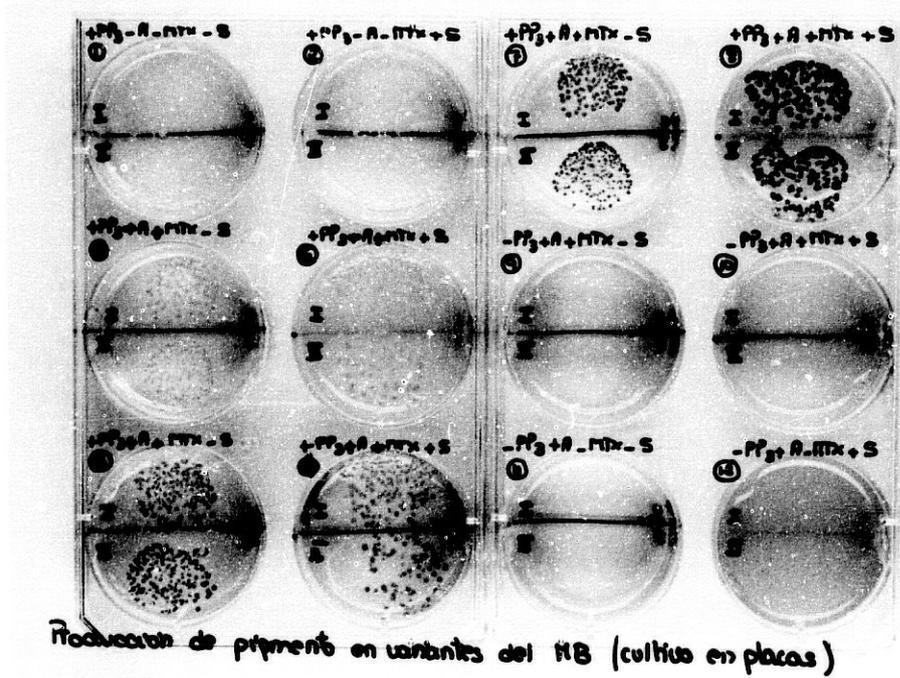
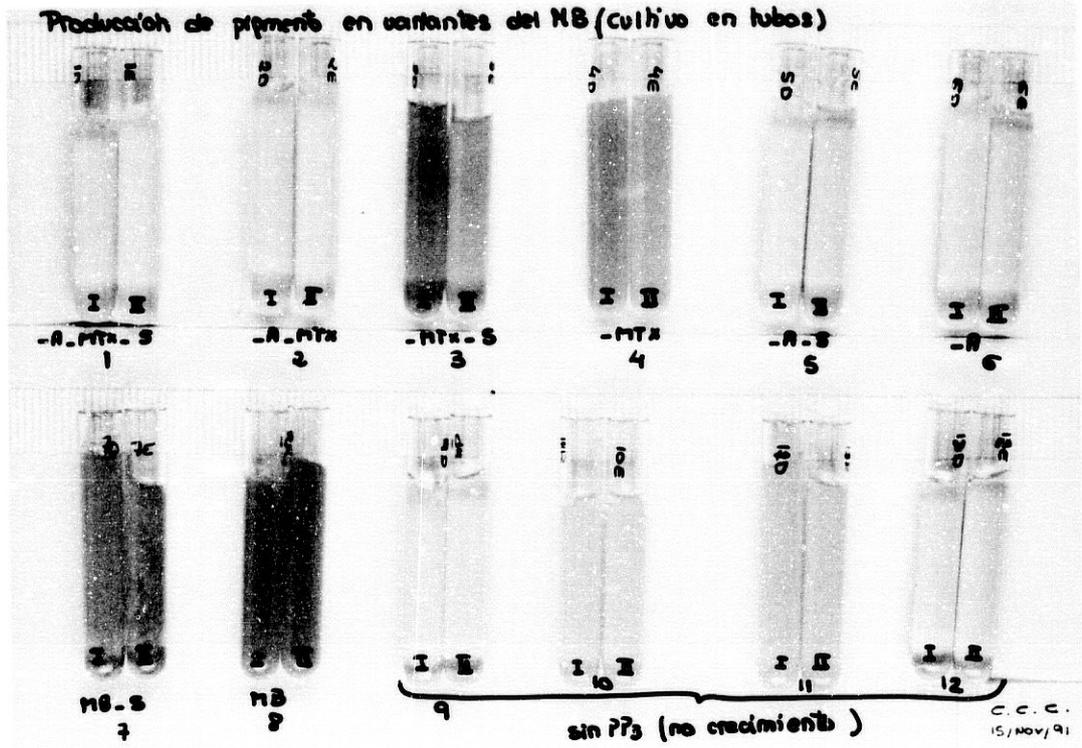


Figura IX y X. Pigmentación producida por EGB en variantes del Medio Base (Cultivo en tubos y en placas)

PP3: Proteosa Peptona N 3; A: almidón; MTX: metotrexato; S: suero de caballo; I, II: Cepas bacterianas.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

Medios: 1. MB sin Almidón, sin MTX, sin Suero 2. MB sin Almidón, sin MTX 3. MB sin MTX, sin Suero 4. MB sin MTX 5. MB sin Almidón, sin Suero 6. MB sin Almidón 7. MB sin Suero 8. MEDIO BASE 9. MB sin PP3, sin MTX, sin Suero 10. MB sin PP3, sin MTX 11. MB sin PP3, sin Suero 12. MB sin PP3

Todos los resultados expuestos a lo largo de este estudio, se refieren a las cepas I, II y III utilizadas en todas las experiencias, mostrando similares intensidades de pigmentación, salvo las excepciones que se detallan en cada caso.

La cepa IV, dada su gran capacidad para producir pigmento ha resultado de poca utilidad al impedir valorar los distintos medios de cultivo entre sí.

Como se detalla en la tabla XI, no existe crecimiento de EGB en los 4 últimos medios enumerados, debido a la no incorporación de Proteosa Peptona ni de ningún otro hidrolizado proteico en la formulación.

La ausencia de almidón en los medios de cultivo, independientemente de la presencia de los otros componentes utilizados como variables, conlleva la desaparición del pigmento en medios sembrados en profundidad (sobrefusión), así como disminución de la pigmentación en la superficie de placas de cultivo.

En medios que no incorporan almidón pero sí metotrexato, se observa una pigmentación amarillenta muy diferente de la de medios que incluyen ambos componentes; así mismo, la mera eliminación de metotrexato se traduce tanto en medios de cultivo sembrados en superficie como en los sembrados en profundidad, en una disminución de la intensidad del pigmento con respecto a la del Medio Base.

La presencia de suero de caballo, se traduce en general, en un mayor tamaño colonial. Independientemente de la presencia de suero en el medio, siempre que existe almidón es posible visualizar el pigmento aunque en los cultivos en placa, hay poca diferencia entre presencia o ausencia de suero. En general, cuando se realizan las experiencias en tubo, la presencia de suero conlleva una producción de pigmento algo más intenso, aunque los resultados son variables de una cepa a otra.

En los medios de cultivo N°6 (MB sin Almidón) y N° 8 (MB), el primero de ellos carente de almidón y en el segundo incorporado a su formulación, hemos introducido otra variable, la adición o no del azúcar glucosa.

La ausencia de glucosa en el Medio Base sin Almidón (N°6) conlleva una disminución del tamaño colonial respecto al observado en el mismo medio adicionado de este azúcar. No obstante y aunque en ausencia de almidón y glucosa, las colonias

son muy pequeñas, con la adición de glucosa aún en medios que no incorporan almidón el tamaño colonial es comparable al de medios en que se incorpora éste y al de medios que contienen almidón pero no glucosa.

4.2. ESTUDIO DE ALMIDON COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION DE *S.AGALACTIAE*

4.2.1. Actividad de almidón y sus fracciones sobre la pigmentación de EGB.

En la tabla XII, detallamos los medios de cultivo empleados como modelo experimental en el estudio del almidón.

El Medio Base incluye en su formulación un 2% almidón soluble (1252 Merck), y es utilizado como medio referencia de pigmentación por el intenso color naranja que presenta EGB, tanto en los cultivos en placas como en tubos. En el MB sin almidón EGB es capaz de crecer pero el pigmento producido en placas de cultivo es amarillento, no visualizándose éste en medios en tubo (Tabla X y Figura VII).

Tabla XII. Influencia de almidón en la formación de pigmento por EGB.

% Almidon en el MB	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
2	Naranja intenso (+ + +)	
1	Naranja intenso (+ + +)	
0'5	Naranja intenso (+ + +)	
0	Naranja-amarillento(+)	No pigmento

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

Así mismo, reflejamos en la tabla XII, la producción de pigmento en medios con una formulación similar al MB pero en los que se ha disminuído la concentración final de almidón al 1% y 0,5%, no observándose diferencias apreciables en la pigmentación aunque la concentración de almidón en el medio sea del 0'5%.

En la Tabla XIII, se enumeran los diferentes almidones empleados en sustitución del almidón del Medio Base (1252 Merck), así como la intensidad de la pigmentación producida en medios que los contienen.

Tabla XIII. Influencia del tipo de almidón empleado en medios de cultivo para formación de pigmento por *S.agalactiae*.

Almidones incorporados al Medio Base	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
Almidón de patata S-4251	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón patata soluble S-2630	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón Soluble Indicador Yodometría Panreac-171096	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón patata hidrolizado para electroforesis S-4501	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón patata S-9765	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón patata Zulkowsky Merck 1257	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón de trigo (Tipo I) S-5127	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón trigo (hid.calor) S-2760	Naranja intenso(+ + +)	
Almidón de arroz S-7260	Naranja intenso(+ + +)	

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

Medio de cultivo: Medio Base sustituyendo el Almidón Merck 1252 por un 2% de los tipos de almidones mencionados.

No hemos encontrado diferencias importantes en cuanto a la intensidad de pigmento con cada uno de los almidones empleados, aunque sí en el aspecto físico final de los medios de cultivo.

Los almidones solubles proporcionan medios de cultivo transparentes mientras que el almidón de patata (S-4251) y los almidones de trigo y de arroz, son difíciles de disolver, forman grumos y dan lugar a medios que dificultan la visualización del pigmento.

En la tabla XIV, mostramos el comportamiento de las fracciones de almidón (amilosa y amilopectina) en sustitución de éste en el medio de cultivo.

Tabla XIV. Pigmento producido por EGB en medios que incorporan fracciones de almidón a diferentes concentraciones.

Fracciones de almidón	%	PIGMENTO	
		Placa	Tubo
Amilosa Tipo III (A-0512)	2	Naranja intenso (+ + +)	
	1	Naranja intenso (+ + +)	
	0'5	Naranja-claro (+ +)	
Amilopectina (A-8515)	2	Naranja-claro (+ +)	
	1	Naranja-amarillento (+)	
	0'5	Naranja-amarillento (+)	

Medio de cultivo: MB sin almidón adicionado de distintas concentraciones de las fracciones de éste.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

‡: concentración final de ambas fracciones en el medio de cultivo.

La fracción amilosa, utilizada en sustitución de almidón en la elaboración de medios de cultivo, apoya la producción de un pigmento naranja intenso por EGB a concentraciones finales en el medio del 2% y 1%. La intensidad de pigmento observada es algo menor cuando se emplea una concentración del 0,5%.

La incorporación de amilopectina a concentraciones finales del 1% y 0,5% hace que EGB produzca una pigmentación en placas anaranjada-amarillenta y en tubos una tonalidad anaranjada muy diferente de la producida por almidón y la

fracción amilosa. Observamos así mismo, una disminución progresiva de la pigmentación y cambio a tonalidad amarillenta a medida que disminuye la concentración de esta fracción en el medio de cultivo.

4.2.2. Actividad de hidrolizados enzimáticos de almidón por acción de β -amilasa sobre la formación de pigmento en EGB.

Debido a que en el proceso de hidrólisis de almidón por β -amilasa se produce maltosa, y la utilización de este azúcar por el microorganismo lleva asociada una disminución de pH en el medio, hemos realizado una serie de medios de cultivo, con el fin de determinar la influencia sobre la pigmentación de la adición de ésta. Para ello, hemos incorporado maltosa a concentraciones del 1% y 2% (cantidades en exceso ya que el límite de sacarificación es de aproximadamente un 55-60% en maltosa) (Myrback, 1948) y eliminado o disminuído la concentración de almidón al 1%.

Los diversos medios obtenidos y las intensidades de pigmentación, se detallan en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII. Influencia sobre la pigmentación de EGB de la adición al Medio Base de diferentes concentraciones de maltosa.

MEDIO DE CULTIVO	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
Medio Base (MB)*	Naranja intenso(+++)	
MB + 2% maltosa	Naranja claro (++)	Naranja- amarillento(+)
MB sin almidón + 2% maltosa	Naranja- amarillento(+)	No pigmento
MB (1% almidón)	Naranja intenso(+++)	
MB (1% almidón)+ 1% maltosa	Naranja claro(++)	
MB sin almidón + 1% maltosa	Naranja- amarillento(+)	No pigmento

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 μ g/ml de metotrexato y 1% agar.

De los resultados de la Tabla XVIII, deducimos en primer lugar que, la disminución de la concentración de almidón al 1% produce una intensidad de pigmento en placa y en tubo muy similar a la que se observa cuando se incorpora un 2% almidón, hecho ya observado en experiencias anteriores (Tabla XII).

En segundo lugar, observamos una disminución en la intensidad de pigmento en medios que incorporan almidón y maltosa, ambos a una concentración del 2% respecto a la del MB (solo incluye un 2% de almidón en su composición). Esta disminución del pigmento se hace más evidente en medios de cultivo en tubo.

Medios sin almidón y con un 2% de maltosa (Tabla XVIII) no producen pigmento en tubo, mostrando en placas el crecimiento de colonias amarillentas.

Observamos también que, la incorporación de almidón (1%) y maltosa (1%) al medio sigue mostrando una disminución en la intensidad del pigmento respecto a medios que sólo contienen un 1% de almidón, pero ésta es menos acusada que cuando la concentración de ambos es del 2%.

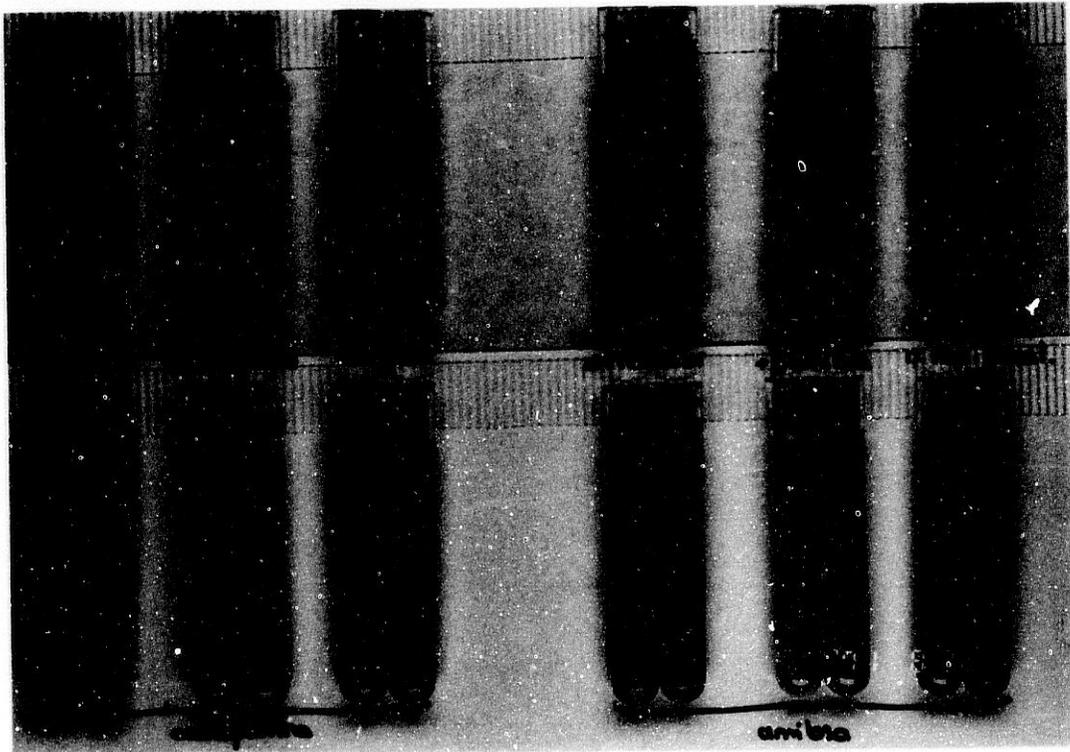
Respecto a la posibilidad que la mera adición del enzima β -amilasa pudiera influir en la pigmentación de EGB, la elaboración de medios con β -amilasa inactivada por calentamiento antes del inicio de su actuación, nos ha permitido comprobar que ello no afecta a la formación de pigmento, ya que la pigmentación observada en medios adicionados de enzima inactivada y medios sin enzima es muy similar.

La incorporación a medios de cultivo en sustitución de almidón de los hidrolizados completos obtenidos mediante el tratamiento con β -amilasa de almidón y de sus fracciones (amilosa y amilopectina) en las condiciones mencionadas en 3.4.4., impide la visualización de la pigmentación de EGB, restableciéndose ésta cuando además del hidrolizado se añade almidón; no obstante, la intensidad de la pigmentación que se alcanza en estos casos es algo menor que cuando se utiliza el almidón o sus fracciones solamente. Este hecho se hace más evidente en medios sembrados en profundidad (Cultivo en tubos) que en los sembrados en superficie (Cultivo en placas) (Figuras XI y XII).



Figura XI. Pigmentación producida por las cepas I y II de EGB en medios que incorporan almidón, amilosa, amilopectina y sus hidrolizados enzimáticos (Cultivo en placas)

Figura XII. Pigmentación producida por las cepas I y II de EGB en medios que incorporan almidón, amilosa, amilopectina y sus hidrolizados enzimáticos (Cultivo en tubos)



Medios: 1. MB (1% almidón 1252 Merck) 2. MB sin almidón 3. MB (1% almidón 1257 Merck) 4. MB (1% almidón) en idénticas condiciones que el hidrolizado 5. MB sin almidón adicionado de 1% de hidrolizado de almidón con β -amilasa 6. MB (1% almidón) adicionado de 1% de hidrolizado de almidón con β -amilasa 7.8.9. Medios idénticos a 4.5.6. pero sustituyendo almidón por amilopectina 10.11.12. Medios idénticos a 4.5.6. pero sustituyendo almidón por amilosa.

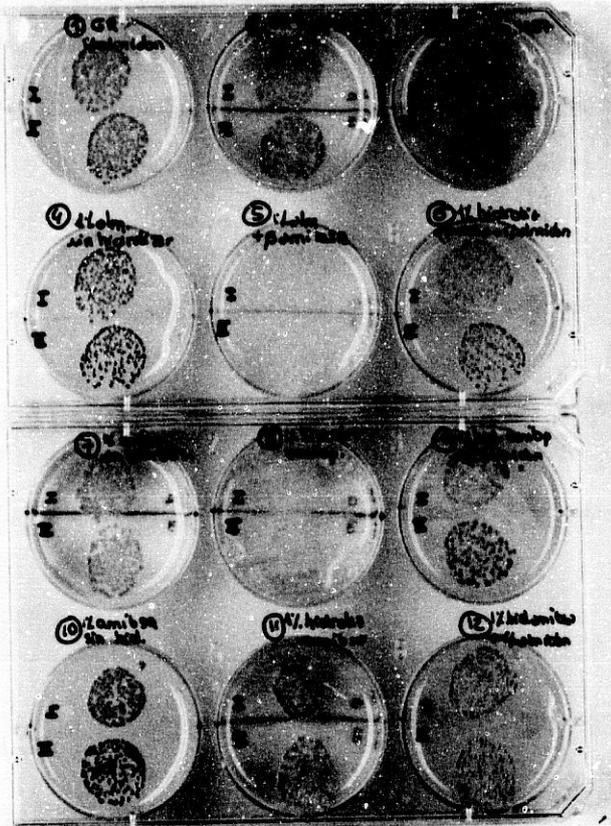
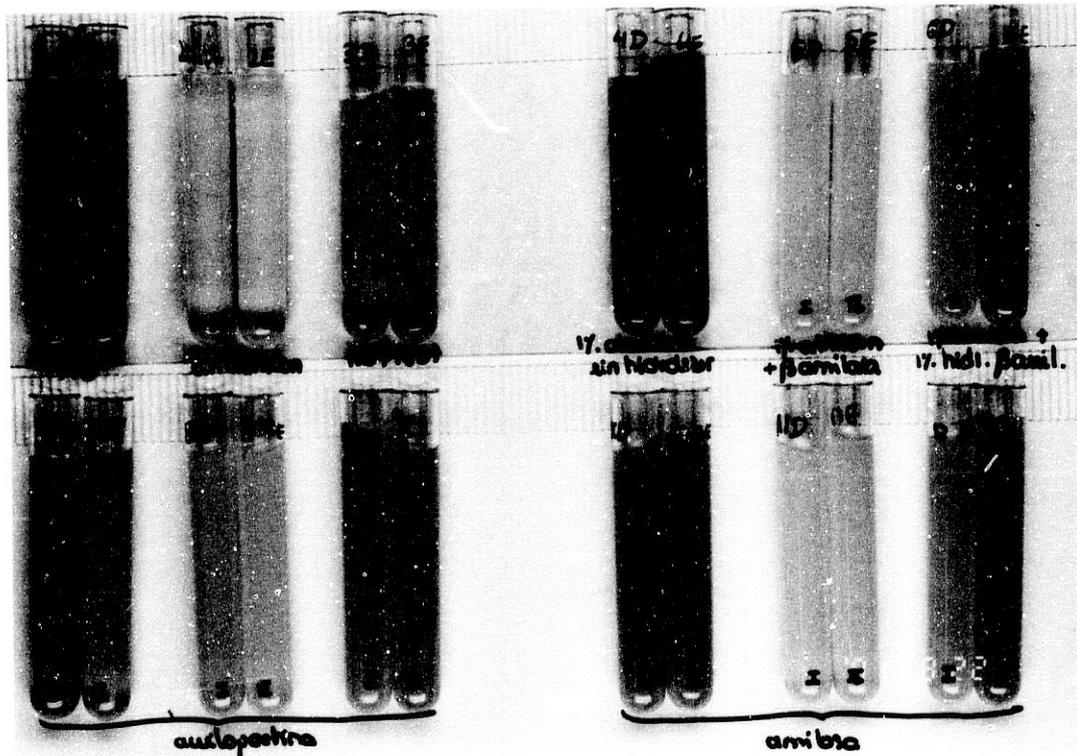


Figura XI. Pigmentación producida por las cepas I y II de EGB en medios que incorporan almidón, amilosa, amilopectina y sus hidrolizados enzimáticos (Cultivo en placas)

Figura XII. Pigmentación producida por las cepas I y II de EGB en medios que incorporan almidón, amilosa, amilopectina y sus hidrolizados enzimáticos (Cultivo en tubos)



Medios: 1. MB (1% almidón 1252 Merck) 2. MB sin almidón 3. MB (1% almidón 1257 Merck) 4. MB (1% almidón) en idénticas condiciones que el hidrolizado 5. MB sin almidón adicionado de 1% de hidrolizado de almidón con β -amilasa 6. MB (1% almidón) adicionado de 1% de hidrolizado de almidón con β -amilasa 7.8.9. Medios idénticos a 4.5.6. pero sustituyendo almidón por amilopectina 10.11.12. Medios idénticos a 4.5.6. pero sustituyendo almidón por amilosa.

Por otra parte y mediante el empleo del modelo bioautográfico, observamos que los hidrolizados parciales de almidón por acción de β -amilasa muestran halos de activación del pigmento hasta un tiempo de actuación enzimática de 12 minutos. A partir de este tiempo de actuación del enzima, no se detecta activación del pigmento por los diversos hidrolizados de almidón incorporados a los pocillos, lo que coincide con la disminución en éstos de la capacidad para formar complejos con yodo (Ver 4.2.4.).

4.2.3. Actividad de Albúmina en sustitución de Almidón sobre la pigmentación de EGB.

En la Tabla XIX, vemos cómo el empleo de Albúmina Bovina (fracción V) a una concentración final en el medio del 2 y 1,5% en sustitución del 2% almidón incorporado en la formulación original del medio basal, no permite el crecimiento de EGB; la disminución de la concentración de albúmina al 1% permite el buen crecimiento de EGB aunque ésta no es capaz de reemplazar al almidón del medio de cultivo en cuanto a producción de pigmento.

Tabla XIX. Efecto de la incorporación de Albúmina en sustitución de Almidón sobre la producción de pigmento por EGB.

MEDIOS DE CULTIVO	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
MB sin Almidón + 1,5% Albúmina	No crecimiento	
MB + 1,5% Albúmina	Naranja claro(++)	
MB sin Almidón + 1% Albúmina	Naranja-amarillento(+)	No pigmento
MB sin Almidón sin Suero + 1% Albúmina	Naranja-amarillento(+)	No pigmento
MB sin Suero + 1% Albúmina	Naranja claro(++)	
MB + 1% Albúmina	Naranja claro(++)	

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato y 1% agar.

Así mismo, podemos observar que la incorporación de almidón junto con albúmina bovina al 1,5% permite el crecimiento de EGB aunque la pigmentación producida es menor que en medios sin albúmina (Medio Base). Esta disminución en la intensidad de pigmento se observa también con la incorporación al Medio Base de albúmina al 1% en relación a éste.

El utilizar como variable en estos medios la adición de suero, nos ha permitido comprobar que albúmina tampoco puede sustituir al Suero incluido en la formulación original del Medio Base en la visualización del pigmento, como también se muestra en 4.4.2.

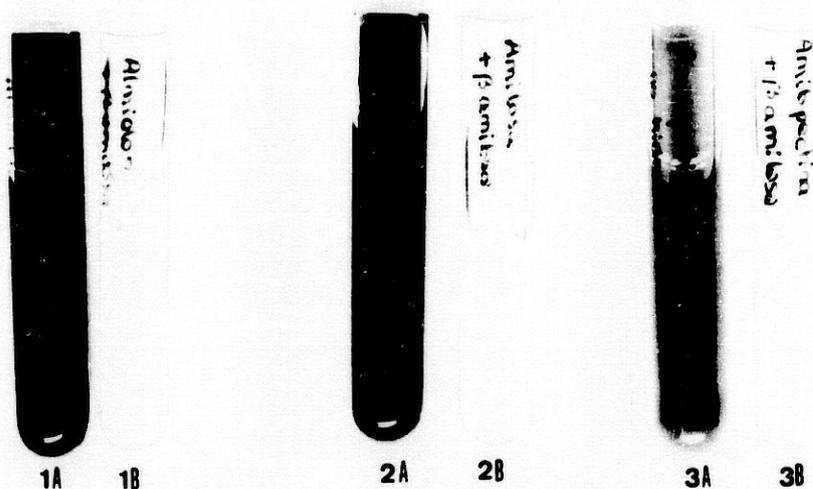
4.2.4. Capacidad de complejar yodo

Todos los almidones ensayados, independientemente de su procedencia y grado de hidrólisis produjeron una coloración azul intensa con solución de I₂/IK, no observándose diferencias destacables en la intensidad y color de unos y otros.

La fracción amilosa produjo una coloración azul intensa semejante a la del almidón completo, frente a la de la fracción amilopectina que simplemente mostró una tonalidad morada.

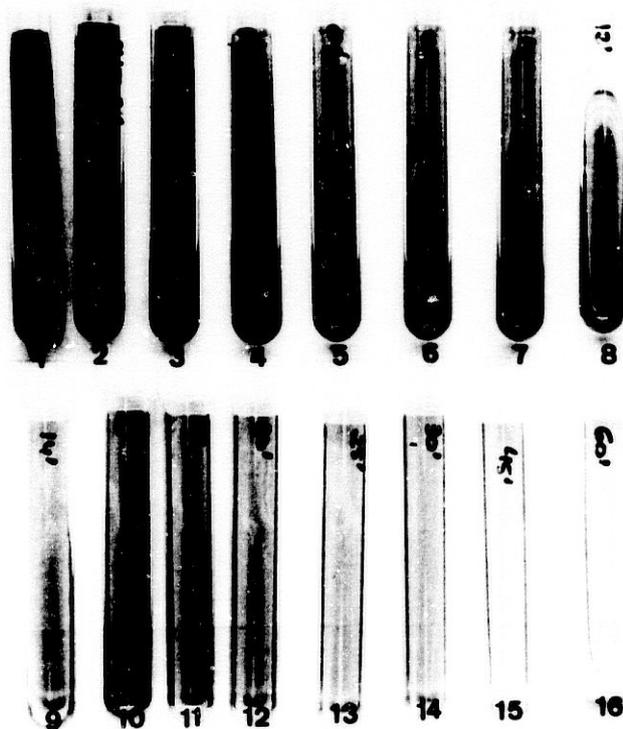
En los hidrolizados completos de almidón y de sus fracciones por acción del enzima β -amilasa, podemos observar cómo desaparece su capacidad para formar el típico complejo con yodo (Figura XIII). Destacamos no obstante que, los hidrolizados parciales de almidón hasta un tiempo de actuación enzimática de 12-14 minutos, formaron un complejo azul intenso con yodo y transcurrido este tiempo el complejo formado presentó una tonalidad violeta semejante a la de la fracción amilopectina (Figura XIV).

Aparte de almidón y la fracción amilosa, ninguno de los otros polisacáridos estudiados mostró coloración azul con yodo; la dextrina tipo I aportó un color morado y tampoco el resto de los carbohidratos ensayados fueron capaces de producir un complejo de coloración azul con yodo.



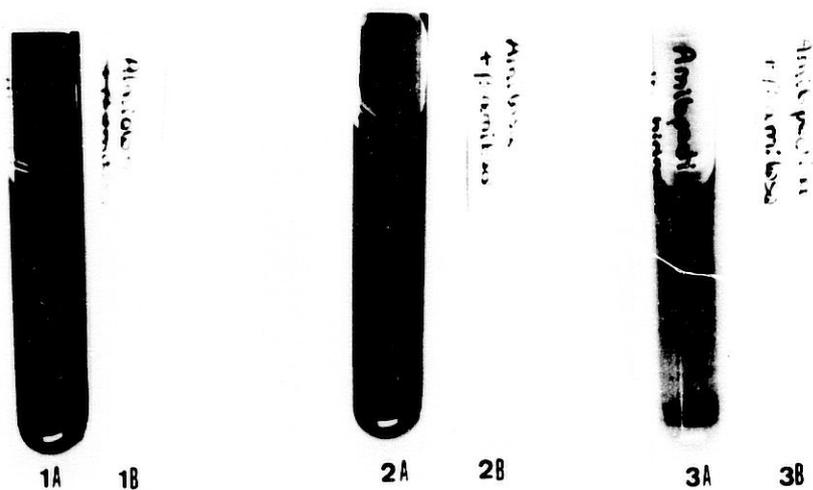
- 1A. Solución del almidón adicionada de yodo 1B. Solución de almidón adicionada de β -amilasa y yodo
 2A. Solución de amilosa adicionada de yodo 2B. Solución de amilosa adicionada de β -amilasa y yodo
 3A. Solución de amilopectina adicionada de yodo 3B. Solución de amilopectina adicionada de β -amilasa y yodo.

Figura XIII. Formación de complejos con yodo de almidón, amilosa y amilopectina y sus correspondientes hidrolizados completos con β -amilasa.



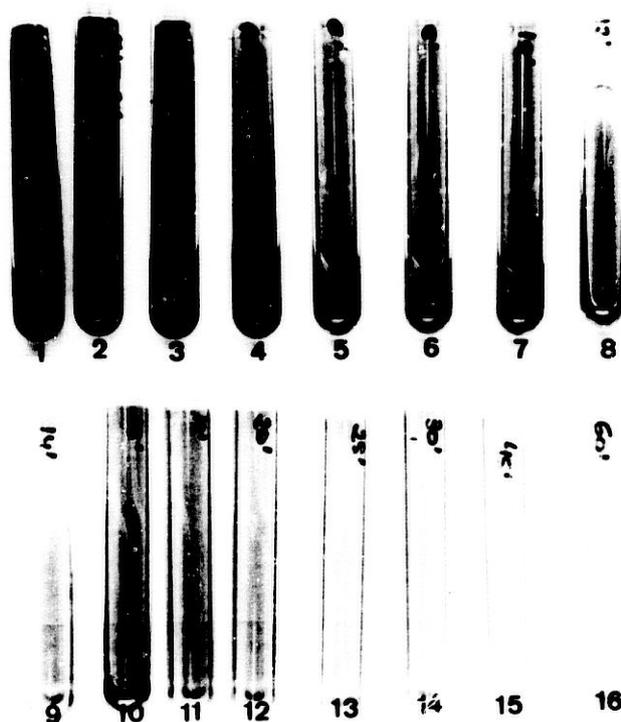
- De izquierda a derecha: 1. Solución de almidón adicionada de yodo 2. Solución de almidón mantenida en iguales condiciones que las necesarias para la hidrólisis enzimática adicionada de yodo 3-16. Soluciones de almidón adicionadas de yodo y β -amilasa a los siguientes tiempos de actuación enzimática: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 45 y 60 minutos.

Figura XIV. Formación de complejos con yodo de hidrolizados de almidón



1A. Solución del almidón adicionada de yodo 1B. Solución de almidón adicionada de β -amilasa y yodo
 2A. Solución de amilosa adicionada de yodo 2B. Solución de amilosa adicionada de β -amilasa y yodo
 3A. Solución de amilopectina adicionada de yodo 3B. Solución de amilopectina adicionada de β -amilasa y yodo.

Figura XIII. Formación de complejos con yodo de almidón, amilosa y amilopectina y sus correspondientes hidrolizados completos con β -amilasa.



De izquierda a derecha: 1. Solución de almidón adicionada de yodo 2. Solución de almidón mantenida en iguales condiciones que las necesarias para la hidrólisis enzimática adicionada de yodo 3-16. Soluciones de almidón adicionadas de yodo y β -amilasa a los siguientes tiempos de actuación enzimática: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 25, 30, 45 y 60 minutos.

Figura XIV. Formación de complejos con yodo de hidrolizados de almidón

4.2.5. Influencia de la incorporación de Almidón al medio de cultivo sobre el espectro de absorción del pigmento de EGB.

El espectro de absorción del pigmento en el Medio Base, Medio Base sin Metotrexato y Medio Base sin Suero (rango de muestreo de 700-350 nm) (Ver 3.4.6.) muestra picos de absorción a longitudes de onda de 525 nm, 485 nm, 460 nm y 440 nm; en el Medio Base sin Almidón, no se detecta ningún pico de absorción en esta misma zona (Figura XVI).

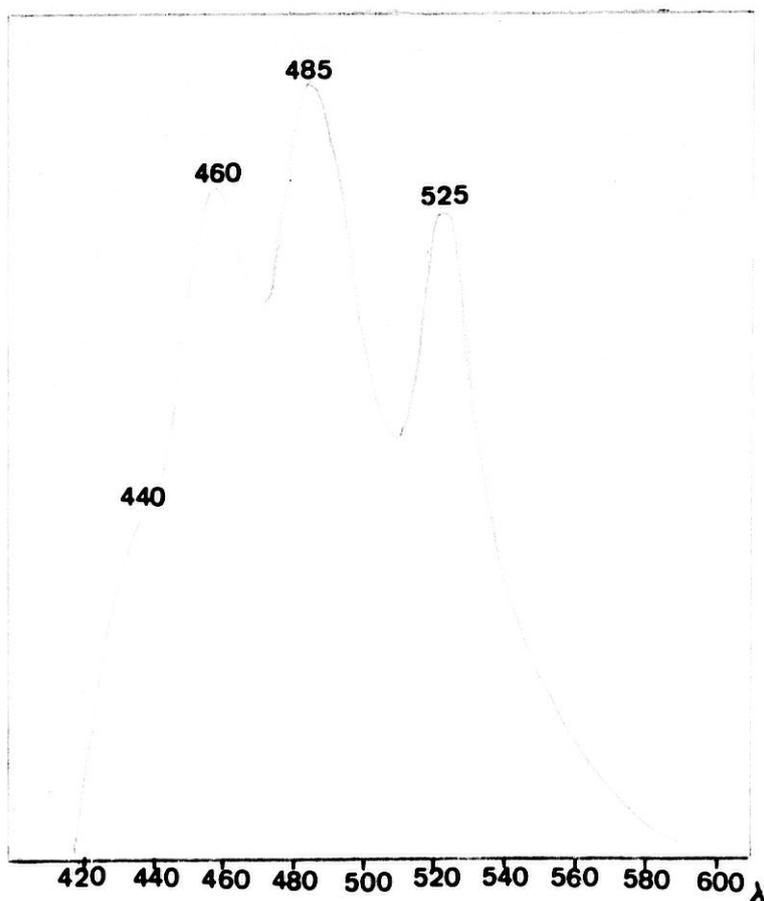


Figura XVI. Espectro de absorción del pigmento en el Medio Base

Tras la adición de β -amilasa al Medio Base previamente inoculado e incubado en condiciones de anaerobiosis y dejando actuar ésta aproximadamente 30 minutos, podemos observar en el espectro la desaparición de los picos anteriormente mencionados y la aparición de un solo pico de absorción a 420 nm (Figura XVII).

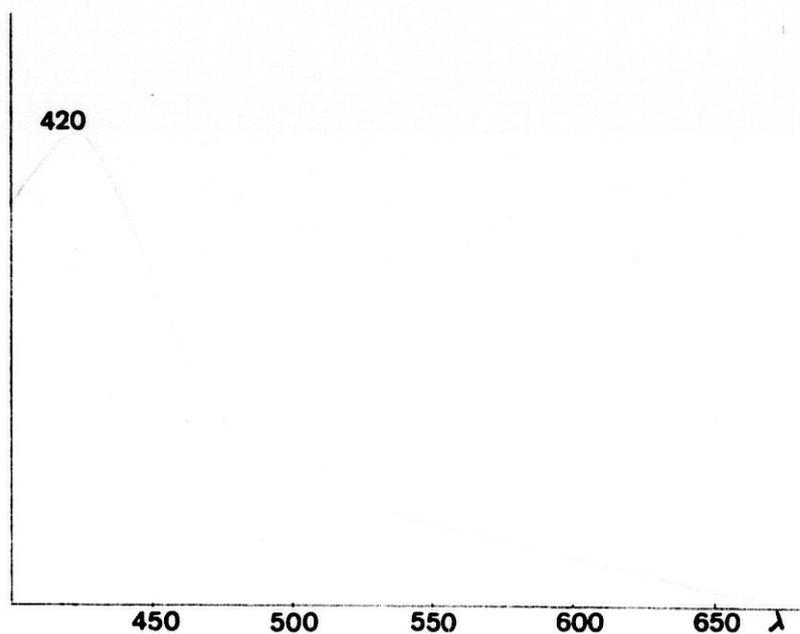


Figura XVII. Espectro de absorción del pigmento en el Medio Base adicionado de β -amilasa

4.2.6. Actividad de otros carbohidratos sobre la formación de pigmento por *S. agalactiae*.

Las tablas XV a XVII, reflejan el comportamiento de EGB en cuanto a formación de pigmento en cada uno de los medios elaborados con polisacáridos, dextranos, dextrinas y otros azúcares en sustitución del almidón en el Medio Base.

Tabla XV. Formación de pigmento por *S. agalactiae* en medios que incorporan polisacáridos diferentes a almidón

Polisacáridos incorporados al MB'	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
Glucógeno	No pigmento	
Inulina	No pigmento	
Carboxi-metil-celulosa	No pigmento	
Metil-celulosa	No pigmento	
Celulosa (Tipo 20)	No pigmento	
Celulosa (fosfato)	No pigmento	
Dextrano PM = 500.000	No pigmento	

Medio: MB sin almidón adicionado de un 2% de los diferentes polisacáridos citados.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

La incorporación de glucógeno al Medio Base en sustitución de almidón lleva a la obtención de un medio final algo más oscuro y opaco que el Medio Base, en el que se observa una pigmentación colonial amarillenta en placa pero sin formación de pigmento en tubo; por el contrario, inulina da lugar a un medio muy transparente pero en el que tampoco se pone de manifiesto la pigmentación de EGB.

Algunos de los derivados de celulosa empleados presentan una disolución difícil, dando lugar a medios opacos, con grumos y amarillentos. No se observa tampoco en ninguno de ellos, la pigmentación característica de EGB en medios de formulación similar pero que incorporan almidón.

En la tabla siguiente, observamos el comportamiento de dextrinas cuando sustituyen al almidón en el Medio Base.

Tabla XVI. Formación de pigmento por EGB en medios que incorporan dextrinas en sustitución de almidón.

Dextrinas incorporadas al MB'	PIGMENTO	
	Placa	Tubo
Dextrina Tipo I	Amarillento	No pigmento
α -ciclodextrina	No pigmento	
β -ciclodextrina	No pigmento	

Medio de cultivo: MB sin almidón adicionado de un 2% de dextrinas.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de metotrexato y 1% agar.

La sustitución de almidón en el medio de cultivo por dextrinas, no permite visualizar la característica pigmentación de EGB; dextrinas tipo I producen un medio muy oscuro y una pigmentación colonial amarillenta en el cultivo en placas, no observándose pigmento en los cultivos en tubo.

Como detallamos en la tabla XVII, Trehalosa, Palatinosa y 1-o-metil- α -D-glucopiranosido, a diferencia de los demás azúcares ensayados en sustitución del

almidón en el MB producen colonias de color anaranjado-marrón (coloración muy diferente al pigmento de EGB en medios que incorporan almidón) aunque en tubo no se observa ningún pigmento. EL resto de los azúcares estudiados, no muestran pigmentación anaranjada ni en los cultivos en placa ni en los de tubo.

Respecto al crecimiento de EGB en medios que incorporan estos azúcares, parece ser similar al del Medio Base con algunas excepciones, que se encuentran detalladas en la tabla XVII.

Destacamos por otro lado, que mediante la técnica bioautográfica no hemos detectado actividad biológica potenciadora del pigmento con ninguno de los carbohidratos utilizados, hecho que concuerda con los resultados de los cultivos en tubos.

Tabla XVII. Pigmentación producida por EGB con la incorporación de diversos carbohidratos al MB en sustitución de almidón

Carbohidratos incorporados al MB	%	PIGMENTO	
		Placa	Tubo
Maltooligosacárido (G ₄ -G ₁₀)	2	No pigmento	
Maltopentaosa	2	No pigmento	
Maltotetraosa	2	No pigmento	
Maltotriosa	2 1	No pigmento No pigmento	
Maltosa	2 1	No pigmento No pigmento	
D(+) glucosa	2 1	No pigmento No pigmento	
D-xilosa	2	No pigmento	
Sacarosa	2	No pigmento	
D(+) galactosa	2	No pigmento	
D(-) fructosa	2	No pigmento	

D-manosa	2	No pigmento	
Salicina	2	No pigmento*	
Trehalosa	2	Naranja-marrón	No pigmento
Ramnosa	2	No pigmento	
L-arabinosa	2	No pigmento	
L(-) sorbosa	2	No pigmento	
Rafinosa	2	No pigmento	
D(+) celobiosa	2	No pigmento	
β -gentibiosa	2	No pigmento	
Palatinosa	2	Naranja-marrón	No pigmento
D(+) melecitosa	2	No pigmento	
Lactosa (monohidrato)	2	No pigmento	
Melibiosa	2	No pigmento	
D(-) manitol	2	No pigmento	
D-sorbitol	2	No pigmento	
Dulcitol	2	No pigmento	
Mio-inositol	2	No pigmento	
Xilitol	2	No pigmento	
Ac.D-glucónico	2	No pigmento	
Acido láctico	2	No pigmento*	
D(+) Turanosa	2	No pigmento	
Esculina	2	No pigmento	
D-amigdalina	2	No pigmento	
β -glicerofosfato	2	No pigmento	
1-o-metil- α -D-glucopiranosido	2	Naranja-marrón	No pigmento
D-glucosa 6 fosfato	2	No pigmento*	

Medio de cultivo: MB sin almidón adicionado de carbohidratos.

Medio Base: 2'5% PP3, 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 $\mu\text{g/ml}$ de netotrexato y 1% agar.

‡: concentración final en el medio de cultivo *: menor tamaño colonial que en el Medio Base.

4.3. ESTUDIO DE PROTEOSA PEPTONA COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION DE *S. AGALACTIAE*.

4.3.1. Actividad de Proteosa Peptona (PP N°3 Difco) sobre la formación de pigmento de EGB.

Experiencias anteriores (Ver 4.1.2.), han puesto de manifiesto que los medios de cultivo carentes de Proteosa Peptona (PP3) no apoyan el crecimiento de EGB. La incorporación de este hidrolizado proteico al medio de cultivo, hace posible el crecimiento del microorganismo al mismo tiempo que favorece la formación de pigmento, siendo no obstante diferentes los requerimientos de Proteosa Peptona que satisfacen cada una de estas funciones.

Nuestros resultados indican, que medios de cultivo que mantienen la formulación original del Medio Base, pero que disminuyen al 0'5% la concentración de Proteosa Peptona, apoyan el desarrollo de EGB pero no permiten la visualización de pigmento. La utilización de este hidrolizado a una concentración final en el medio del 1%, conlleva la formación de una pigmentación anaranjada tanto en los cultivos en placas como en tubos y una concentración de Proteosa Peptona del 2'5% (Medio Base) se traduce en la visualización de una pigmentación naranja intensa.

Utilizando el modelo experimental de placas con pocillos (Técnica bioautográfica) y como medio de cultivo el Medio Base eliminado la Proteosa Peptona (PP3), observamos que la concentración de Proteosa Peptona incorporada a los pocillos, es fundamental en la visualización de pigmento ya que se produce una actividad potenciadora de éste tras la incorporación de 100 μ l de una solución de Proteosa Peptona a concentraciones del 20 y 10% (siendo las intensidades observadas de ++ y de + respectivamente, constituyendo éstos los controles respecto a los que referimos el resto de las intensidades de activación), no observándose ningún halo de activación alrededor de pocillos usando igual volumen de Proteosa Peptona a concentraciones del 5% y 2,5%. A estas últimas concentraciones de PP3, no se visualiza halo de pigmentación aunque es posible observar un halo de crecimiento de

EGB alrededor de los pocillos en los que se incluyen en relación al resto de la placa.

Por otro lado, observamos también que a medida que se incrementa la concentración de la Proteosa Peptona (PP3) incluida en la formulación del medio (comparamos MB sin PP3 frente a MB con 0'5% de PP3), se requiere una menor concentración de este hidrolizado en los pocillos para conseguir la misma intensidad de pigmentación (Tabla XXIV, XXVII).

La utilización de diversos medios de cultivo para determinar la influencia de Proteosa Peptona y análogos sobre la formación de pigmento, se debe a las diferencias de pigmentación observadas entre ellos. Así pues, en el modelo experimental de placas con pocillos utilizando como medio de cultivo el Medio Base, no podemos detectar halos de activación del pigmento alrededor de los pocillos, puesto que debido a su composición (incluye 2'5% de Proteosa Peptona), el pigmento de fondo que se forma es tan intenso que impide su visualización; por el contrario, este medio es útil en la detección de inhibidores de la pigmentación.

Contrariamente, a lo que ocurre en el Medio Base, medios que incorporan solamente un 0,5% de Proteosa Peptona (PP3), producen un pigmento anaranjado muy débil, siendo por ello útiles para detección de activadores, impidiendo la visualización de inhibidores de la pigmentación.

Actividad de Ultrafiltrados de Proteosa Peptona (PP3)

El procedimiento de obtención de las fracciones de Proteosa Peptona que mencionamos en la Tabla XX, se expuso en 3.5.2.

Como podemos observar en la Tabla XX, la fracción de Proteosa Peptona retenida mediante el empleo de una membrana de NMWC (Nominal Molecular Weight Cut-off) de 100.000, no presenta actividad potenciadora de la pigmentación de EGB mientras que sí se detecta esta actividad en el ultrafiltrado obtenido.

Tabla XX. Actividad de fracciones de Proteosa Peptona N°3 obtenidas mediante ultrafiltración sobre la pigmentación de EGB.

Fracciones de Proteosa Peptona	PIGMENTO (M.bioautográfico)
Retenido (NMWC 100.000)	Sin efecto
Ultrafiltrado (NMWC 100.000)	Activa (++)
Retenido (NMWC 10.000)	Sin efecto
Ultrafiltrado (NMWC 10.000)	Activa (++)
Ultrafiltrado (NMWC 10.000) y Retenido (NMWC 1.000)	Sin efecto
Ultrafiltrado (NMWC 1.000)	Activa (+)

Medio: MB (disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 0'5%) y MB (disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 1%).

En la Tabla reflejamos también, la actividad potenciadora del pigmento manifestada por los ultrafiltrados de Proteosa Peptona a través de membranas de NMWC de 10.000 y 1.000 aunque en este último caso, se detecta un menor halo de activación del pigmento. Esta actividad potenciadora de los ultrafiltrados de Proteosa Peptona, se observa por igual en medios que incorporan 0,5% y 1% de Proteosa Peptona (PP3).

Actividad de Hidrolizados enzimáticos de Proteosa Peptona

Los hidrolizados trípticos de Proteosa Peptona, como apreciamos en la Tabla XXI, no actúan como potenciadores de la formación de pigmento, sino que por el contrario, se observa un halo de inhibición del pigmento en medios que incorporan Proteosa Peptona a concentraciones del 1% y 2'5%.

Tabla XXI. Efecto de hidrolizados trépticos de Proteosa Peptona sobre la producción de pigmento por EGB (Método bioautográfico).

Hidrolizados Trépticos de PP3	PIGMENTACION		
	MB(0,5% PP3)	MB(1% PP3)	MB(2'5% PP3)
PP3 10%	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=7'8 20mM Ca ²⁺	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% + tripsina [*] pH=7'8 20mM Ca ²⁺	Activa(++)	Activa(+)	Sin efecto
PP3 10% + tripsina ^{**} pH=7'8 20mM Ca ²⁺	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
PP3 10% + tripsina ^{***} pH=7'8 20mM Ca ²⁺	Sin efecto	Inhibe(#)	Inhibe(#)
PP3 10% + tripsina ^{****} pH=7'8 20mM Ca ²⁺	Sin efecto	Inhibe(#)	Inhibe(#)
Tripsina 2'5%	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto

Medio Base (MB): 2'5% Proteosa Peptona (PP3), 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

Medios: MB (0'5% PP3): MB disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 0'5%; MB (1% PP3): MB disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 1%; MB (2'5% PP3): Medio Base.

+++, ++, +: grados de intensidad del pigmento según el halo de activación formado alrededor de los pocillos

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el halo de reversión formado alrededor de los pocillos

*: Tripsina inactivada rápidamente tras su adición **: Tripsina inactivada tras 2 horas de actividad enzimática

: Tripsina inactivada tras 16 horas de actuación del enzima *: Tripsina inactivada tras 40 horas de actividad enzimática.

En la Tabla XXII, queda reflejado cómo los hidrolizados pépticos de Proteosa Peptona a diferencia de los trépticos, mantienen su actividad potenciadora en la formación del pigmento, independientemente del tiempo de actuación del enzima.

Tabla XXII. Efecto de hidrolizados de Proteosa Peptona por acción de Pepsina sobre la formación de pigmento en EGB (Método bioautográfico).

Hidrolizados Pépticos de PP3	PIGMENTACION		
	MB(0,5% PP3)	MB(1% PP3)	MB(2'5% PP3)
PP3 10%	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=2	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=2 + pepsina'	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=2 + pepsina''	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=2 + pepsina'''	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
PP3 10% pH=2 + pepsina''''	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
Pepsina 1%	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto

Medio Base (MB): 2'5% Proteosa Peptona (PP3), 2% almidón, 5% Suero de caballo, 0'25% glucosa, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 1% Piruvato sódico, 0'02% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato y 1% agar.

Medios: MB (0'5% PP3): MB disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 0'5%; MB (1% PP3): MB disminuyendo la concentración de Proteosa Peptona al 1%; MB (2'5% PP3): Medio Base.

++, +, -: grados de intensidad del pigmento según el halo de activación formado alrededor de los pocillos

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el halo de reversión formado alrededor de los pocillos

*: Pepsina inactivada rápidamente tras su adición **: Pepsina inactivada tras 2 horas de actividad enzimática

: Pepsina inactivada tras 16 horas de actuación del enzima *: Pepsina inactivada tras 40 horas de actividad enzimática.

Actividad de Dializados de Proteosa Peptona (PP3)

Al realizar una diálisis de 20 ml de una disolución de Proteosa Peptona al 10% frente a un volumen igual de agua, observamos que tanto la fracción retenida en la membrana de diálisis como el dializado, presentan un efecto activador del pigmento manifestado por la presencia de un halo anaranjado alrededor de los pocillos en los que

manifestado por la presencia de un halo anaranjado alrededor de los pocillos en los que

se incorporan. Esta activación de la pigmentación, se visualiza en medios que incluyen en su composición un 0,5% y 1% de Proteosa Peptona. Así mismo, se detecta una disminución del efecto activador del retenido, cuando agotamos la Proteosa Peptona dializando frente a grandes volúmenes de agua, obtenidos por cambios repetidos y frecuentes de ésta.

4.3.2. Actividad de otros hidrolizados proteicos en la pigmentación de EGB.

En la tabla XXIII, mostramos la formación de pigmento en medios de cultivo que incluyen en lugar de Proteosa Peptona N°3 (Difco) otros hidrolizados proteicos.

Tabla XXIII. Influencia sobre la formación de pigmento por EGB en medios que incorporan diversos hidrolizados proteicos (Modelo Placa-Tubo).

Hidrolizados Proteicos	PIGMENTO
Proteosa Peptona N°2 (Difco)	Naranja intenso(+ + +)
Proteosa Peptona (Difco)	Naranja intenso(+ + +)
Proteosa Peptona (Oxoid)	No pigmento
Peptona (Difco)	No pigmento
Peptamina (Difco)	Naranja intenso(+ + +)
Triptona (Difco)	No pigmento
Triptosa (Oxoid)	No pigmento
Lab-Lemco (Oxoid)	No pigmento
Hidrolizado de lactoalbúmina(Oxoid)	No pigmento
Cas-aminoácidos (Difco)	No pigmento
Cas-aminoácidos sin Vitaminas(Difco)	No pigmento

Podemos observar, una pigmentación naranja intensa similar a la producida por EGB en medios que incorporan Proteosa Peptona N°3, en los cultivos de placas y tubos en cuya composición se incluye: Proteosa Peptona N°2 (Difco), Proteosa Peptona (Difco) y Bacto Peptamina (Difco). La sustitución de PP3 por los demás hidrolizados proteicos conlleva la no visualización del pigmento.

Con la utilización de Cas-Aminoácidos con/sin Vitaminas en sustitución de Proteosa Peptona en el medio de cultivo, se produce menor crecimiento de EGB que con la adición de ésta o del resto de los hidrolizados.

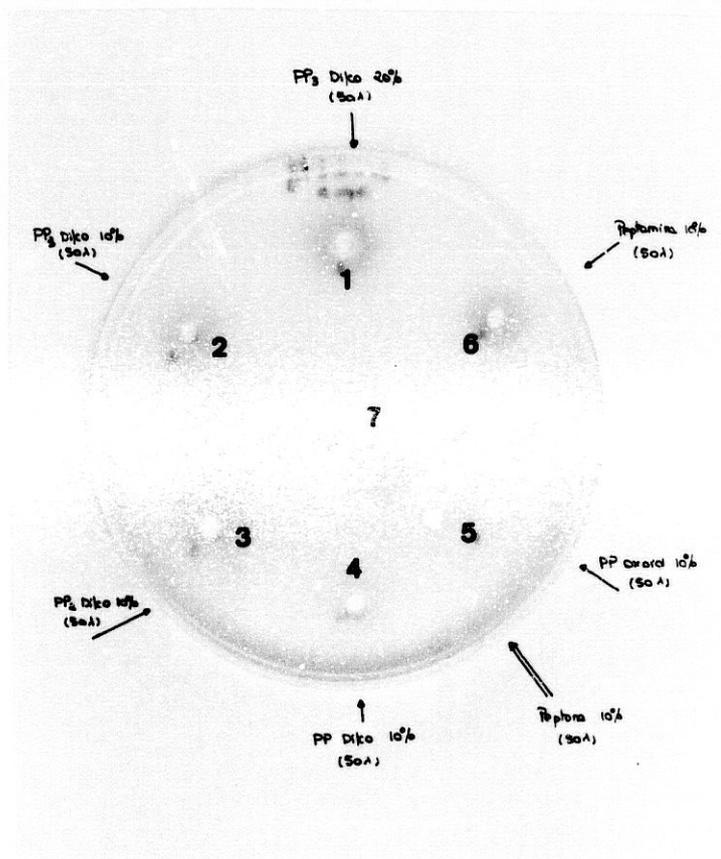
Mediante bioautografía, hemos comprobado el efecto activador o inhibidor de estos hidrolizados proteicos sobre la pigmentación de EGB. Los mismos hidrolizados, que hemos citado anteriormente, como productores de pigmento en cultivos de placas y tubos, forman un halo de activación de éste alrededor de los pocillos en los que se incluyen (Figura XV).

Por otra parte, Triptona (Difco) y Triptosa (Oxoid), muestran un pequeño halo de inhibición del pigmento alrededor de los pocillos en los que se encuentran.

En las tablas XXIV, XXV y XXVI, detallamos el efecto de la incorporación a pocillos de diferentes concentraciones de hidrolizados proteicos, utilizando como medio de cultivo el Medio Base sin Proteosa Peptona N°3. En los casos en que no se produce halo de pigmento alrededor del pocillo, hemos reflejado si se produce alrededor de éste un halo de crecimiento del microorganismo.

A continuación en las tablas XXVII, XXVIII y XXIX, se muestra cómo la concentración de Proteosa Peptona N°3 (Difco) en el medio de cultivo (0,5%, 1%, 2,5%) junto con la concentración de la solución del hidrolizado incorporado a los pocillos influye en la capacidad de formación y visualización del pigmento.

Figura XV. Efecto de diversos hidrolizados proteicos sobre la pigmentación de *S. agalactiae* (Método bioautográfico)



Medio de cultivo: MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

Hidrolizados proteicos ensayados

Pocillo 1. PP N°3 (Difco) al 20% (50 μ l)
 Pocillo 3. PP N°2 (Difco) al 10% (50 μ l)
 Pocillo 5. PP (Oxoid) al 10% (50 μ l)
 Pocillo 7. Peptona (Difco) al 10% (50 μ l).

Pocillo 2. PP N°3 (Difco) al 10% (50 μ l)
 Pocillo 4. PP (Difco) al 10% (50 μ l)
 Pocillo 6. Peptamina (Difco) al 10% (50 μ l)

Tabla XXIV. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento y formación de pigmento por *S. agalactiae* en el Medio Base sin Proteosa Peptona (Método bioautográfico) (I)

Hidrolizados proteicos	%	Pigmento	Halo de crecimiento
PP nº3 (Difco)	20	Activa (++)	
	10	Activa (+)	
	5	Sin efecto	Si
	2,5		
	1,25		
PP nº2 (Difco)	20	Activa (+)	
	10	No crecimiento	
	5		
	2,5		
PP (Difco)	20	Activa (++)	
	10	Activa (+)	
	5	Sin efecto	Si
	2,5		
	1,25	No crecimiento	
PP (Oxoid)	20	Sin efecto	Si
	10		
	5	No crecimiento	
	2,5		

‡: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos.

+++, ++, +: grado de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo.

Tabla XXIV. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento y formación de pigmento por *S.agalactiae* en el Medio Base sin Proteosa Peptona (Método bioautográfico) (II)

Hidrolizados proteicos	%	Pigmento	Halo de crecimiento
Peptamina (Difco)	20	Activa(+++)	
	10	Activa(++)	
	5	Activa(+)	
	2,5	Sin efecto	Si
	1,25		
Peptona (Difco)	20	Sin efecto	Si
	10		
	5		
	2,5		
Tryptona (Difco)	20	Sin efecto	Si
	10		
	5		
	2,5		
Tryptosa (Oxoid)	20	Sin efecto	Si
	10		
	5	No crecimiento	
	2,5		

‡: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos

+++, ++, +: grados de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo.

Tabla XXIV. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre el crecimiento y formación de pigmento por *S. agalactiae* en el Medio Base sin Proteosa Peptona (Método bioautográfico) (III)

Hidrolizados proteicos	%	Pigmento	Halo de crecimiento
Lab-Lemco (Oxoid)	20	Sin efecto	Si
	10		
	5	No crecimiento	
	2,5		
Hidrolizado de lactoalbumina (Oxoid)	20	No crecimiento	
	10		
	5		
	2,5		
Cas-Aminoacidos(Difco)	20	No crecimiento	
	10		
	5		
	2,5		
Cas-aminoacidos sin Vitaminas (Difco)	20	No crecimiento	
	10		
	5		
	2,5		

‡: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos

++, ++, +: grado de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo.

Tabla XXVII. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre la formación de pigmento por *S.agalactiae* a medios de cultivo con diferentes concentraciones de Proteosa Peptona N°3 (I).

Hidrolizados proteicos	%	PIGMENTACION		
		MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2'5% PP3)
PP N°3 (Difco)	20	Activa(+++)	Activa(+++)	Sin efecto
	10	Activa(++)	Activa(++)	
	5	Activa(+)	Activa(+)	
	2,5	Sin efecto	Sin efecto	
	1,25			
PP N°2 (Difco)	20	Activa(++)	Activa(++)	Sin efecto
	10	Activa(+)	Activa(+)	
	5	Sin efecto	Sin efecto	
	2,5			
PP (Difco)	20	Activa(+++)	Activa(+++)	Sin efecto
	10	Activa(++)	Activa(++)	
	5	Activa(+)	Activa(+)	
	2,5	Sin efecto	Sin efecto	
PP (Oxoid)	20	Activa(+)	Activa(+)	Sin efecto
	10	Sin efecto	Sin efecto	
	5			
	2,5			

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona)
 MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%)
 MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

‰: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos

+++ , ++ , +: grado de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo.

Tabla XXVIII. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre la formación de pigmento por *S.agalactiae* a medios de cultivo con diferentes concentraciones de Proteosa Peptona N°3 (II).

Hidrolizados proteicos	%	PIGMENTACION			
		MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2'5% PP3)	
Peptamina (Difco)	20	Activa (+++)		Sin efecto	
	10	Activa (+++)			
	5	Activa (++)			
	2,5	Activa (+)			
	1,25	Sin efecto			
Peptona (Difco)	20	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto	
	10				
	5				
	2,5				
Tryptona (Difco)	20	Sin efecto	Inhibe (#)	Inhibe (#)	
	10		Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	5				
	2,5				
Tryptosa (Oxoid)	20	Sin efecto	Inhibe (#)	Inhibe (#)	
	10		Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	5				
	2,5				

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1% y MB (disminuyendo l. concentración de PP3 al 0'5%).

‡: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos

+++ , ++ , +: grado de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo alrededor del pocillo

, ## , #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo alrededor del pocillo

Tabla XXIX. Efecto de la incorporación de hidrolizados proteicos sobre la formación de pigmento por *S.agalactiae* a medios de cultivo con diferentes concentraciones de Proteosa Peptona N°3 (III).

Hidrolizados proteicos	%	PIGMENTACION		
		MB (0'5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2'5% PP3)
Lab-Lemco (Oxoid)	20	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	10			
	5			
	2,5			
Hidrolizado de Lactoalbúmina (Oxoid)	20	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	10			
	5			
	2,5			
Cas-aminoácidos (Difco)	20	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	10			
	5			
	2,5			
Cas-aminoácidos sin Vitaminas(Difco)	20	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
	10			
	5			
	2,5			

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1% y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

‡: concentración de las soluciones adicionadas a los pocillos

4.3.3. Actividad de Vitaminas en la formación de pigmento por EGB

La incorporación de una mezcla vitamínica, utilizando el método bioautográfico a pocillos del Medio Base (2'5% de Proteosa Peptona) y del Medio Base con un 1% de Proteosa Peptona, produce un halo de inhibición del pigmento alrededor de los pocillos en que se adicionan (Tabla XXX).

Tabla XXX. Efecto de la incorporación de vitaminas sobre la formación de pigmento por EGB (Método bioautográfico).

VITAMINAS	PIGMENTACION		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Mezcla Vitaminas*	Sin efecto	Inhibe(###)	Inhibe(###)
Mezcla Vitaminas sin tiamina*		Sin efecto	Sin efecto
Riboflavina (0'01 g/l)	Sin efecto	Inhibe (##)	Sin efecto
Tiamina (0'1 g/l)		Sin efecto	
Biotina (0'1 g/l)		Sin efecto	
Pantotenato Cálcico (0'1 g/l)		Sin efecto	
Cloruro de colina (0'1 g/l)		Sin efecto	
Acido fólico (0'1 g/l)		Sin efecto	
i-inositol (0'2 g/l)		Sin efecto	
Nicotinamida (0'1 g/l)		Sin efecto	
Piridoxal (0'1 g/l)		Sin efecto	

Medios: MB(2'5% Proteosa Peptona), MB(disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

Mezcla de Vitaminas*: Concentrado de Vitaminas para Medio Basal de Eagle (Laboratorios Flow) que incluye las vitaminas citadas como incorporadas a pocillos a la concentración especificada para las vitaminas ensayadas individualmente.

Mezcla de Vitaminas sin Tiamina*: Concentrado de Vitaminas de igual composición y concentración que la anterior eliminando la tiamina.

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo formado alrededor del pocillo

Por otro lado, observamos en la Tabla anterior que la utilización individual de cada una de las vitaminas incluídas en esta mezcla y a la misma concentración que se encuentran en ésta, produce efecto inhibitor únicamente en el caso de tiamina. Esta inhibición del pigmento manifestada por tiamina, solo se observa en medios con 1% de Proteosa Peptona frente al de la mezcla de vitaminas que se observa también en el Medio Base, por lo que parece que la tiamina individualmente tiene menor actividad inhibitora que la mezcla.

Así mismo, se muestra que la eliminación de tiamina de la mezcla vitamínica, conlleva la desaparición del efecto inhibitor de la pigmentación de EGB.

4.3.4. Actividad de Acidos Nucleicos sobre la formación de pigmento por EGB

La utilización de soluciones acuosas de DNA y RNA así como sus hidrolizados a concentraciones del 0.5% y 1% en NaOH 0,1N, producen en primer lugar, un halo de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor del pocillo aunque seguidamente, se observa un pequeño halo de potenciación del pigmento.

4.3.5. Actividad de Aminoácidos sobre la formación de pigmento por EGB

No hemos observado efecto inhibitor de la pigmentación en ninguno de los aminoácidos ensayados, aunque sí un efecto potenciador del concentrado de aminoácidos esenciales sin L-glutamina (Laboratorios Flow) y un ligero efecto activador de Triptófano utilizado de forma individual. El efecto de éste último, no es comparable al proporcionado por la mezcla de aminoácidos aunque su eliminación de ésta conlleva la no visualización del efecto activador del pigmento.

Tabla XXXI. Efecto de la incorporación de Aminoácidos sobre la pigmentación de EGB (Método bioautográfico).

AMINOACIDOS	PIGMENTACION		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Mezcla Aminoácidos (AA) No Esenciales (100X)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
Mezcla AA Esenciales sin L- Glutamina (50X)	Activa(+)	Activa(++)	Sin efecto
Mezcla AA Esenciales sin Glutamina sin Triptofano(50X)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
L-arginina (6'32 g/l)	Sin efecto	Sin efecto	Sin efecto
L-cistina (1'42 g/l)			
L-histidina (2'1 g/l)			
L-iso-leucina (2'63 g/l)			
L-leucina (2'63 g/l)			
L-lisina (3'65 g/l)			
L-metionina (0'75 g/l)			
L-fenilalanina (1'65 g/l)			
L-treonina (2'38 g/l)			
L-triptófano (0'51 g/l)			
L-tirosina (2'25 g/l)	Sin efecto		
L-valina (2'35 g/l)			

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

Concentrado de Aminoácidos No esenciales para MEM de Eagle (100X) (Laboratorios Flow): Mezcla de los siguientes aminoácidos no esenciales (Alanina, Asparagina, Acido aspártico, Glicina, Acido glutámico, Prolina, Serina) a la concentración especificada en Material y Métodos (Ver 3.5.6.).

Concentrado de Aminoácidos Esenciales para MEM de Eagle (50X) (Laboratorios Flow): Mezcla de los siguientes aminoácidos esenciales (Arginina, Cistina, Histidina, Isoleucina, Leucina, Lisina, Metionina, Fenilalanina, Treonina, Triptofano, Tirosina y Valina) a la concentración indicada para los aminoácidos individualmente ensayados.

+++, ++, +, +/-: grados de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo

4.3.5. Actividad de Extracto de Levadura en la formación de pigmento por EGB

La sustitución de la Proteosa Peptona N°3 incluida en la formulación original del Medio Base por Extracto de Levadura a la misma concentración que ésta, en medios de cultivo distribuidos en placas y tubos, no permite visualizar la pigmentación de EGB. Este hecho concuerda, con la no formación de halo de activación de pigmento alrededor de pocillos en los que se incluye este extracto en medios con diferentes concentraciones de Proteosa Peptona.

En medios que contienen Proteosa Peptona N°3, a concentraciones del 1% y 2,5% (MB), se observa que el Extracto de Levadura ejerce un potente efecto inhibitorio (reversión) del pigmento. Por lo que, podemos utilizar la incorporación de una solución al 10% (100 μ l) de este extracto, como control de inhibición del pigmento (grado de inhibición ###).

Tabla XXXII. Efecto sobre la formación de pigmento de la incorporación de Extracto de Levadura a pocillos de medios que incorporan diferentes concentraciones de Proteosa Peptona.

EXTRACTO DE LEVADURA	PIGMENTACION		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Exto.levadura 10%	Sin efecto	Inhibe(###)	Inhibe(###)
Exto.levadura 5%		Inhibe(###)	Inhibe(###)
Exto.levadura 2,5%		Inhibe(###)	Inhibe(###)
Exto.levadura 1,25%		Inhibe(##)	Inhibe(##)
Exto.levadura 0,625%		Inhibe(##)	Inhibe(##)

Medio de cultivo: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo formado alrededor de los pocillos

Actividad de Dializados de Extracto de Levadura

Tanto la fracción retenida en la membrana de diálisis como el dializado de una disolución al 10% de Extracto de Levadura (Ver 3.5.7.) siguen mostrando un efecto inhibitor de la pigmentación, puesto de manifiesto por la presencia de un halo de inhibición del pigmento alrededor de pocillos que los incorporan en medios de cultivo con un 1% y 2'5% de Proteosa Peptona.

Actividad de Ultrafiltrados de Extracto de Levadura

En la Tabla XXXIII, observamos que se producen halos de inhibición de la pigmentación cuando incorporamos a pocillos las diferentes fracciones de Extracto de Levadura obtenidas mediante ultrafiltración.

Tabla XXXIII. Actividad de fracciones de Extracto de levadura obtenidas mediante ultrafiltración sobre la pigmentación de EGB.

Fracciones de Exto. Levadura	MEDIOS DE CULTIVO		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Extracto de levadura 10%	Sin efecto	Inhibe(###)	Inhibe(###)
Fracción > 10.000 d		Inhibe(##)	Inhibe(##)
Fracción < 10.000 d		Inhibe(###)	Inhibe(###)
Fracción > 1.000 < 10.000 d		Inhibe(##)	Inhibe(##)
Fracción < 1.000 d		Inhibe(###)	Inhibe(###)

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo de inhibición formado alrededor de los pocillos

Actividad de Extracto de Levadura tras autoclavado

Tras autoclavar el extracto de levadura al 10% a pH alcalino para destruir la tiamina presente, se observa un halo de inhibición del pigmento similar al producido por este mismo extracto autoclavado sin variar las condiciones de pH.

Hidrolizados enzimáticos de Extracto de Levadura

Como se refleja en las tablas XXXIV y XXXV, los hidrolizados pépticos y trípticos de Extracto de levadura mantienen la actividad inhibidora de la formación de pigmento característica del extracto de partida.

Tabla XXXIV. Efecto sobre la pigmentación de EGB de hidrolizados pépticos de Extracto de Levadura.

Hidrolizados de Exto. Levadura	PIGMENTACION		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Extracto de Levadura 10%	Sin efecto	Inhibe (###)	Inhibe (###)
Exto. Levadura 10% pH=2			
Exto. Levadura + pepsina *			
Exto. Levadura + pepsina **		Sin efecto	Sin efecto
Solución pepsina 1%			

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

*: Pepsina inactivada rápidamente tras su adición **: Pepsina inactivada tras 40 horas de actuación enzimática

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo de inhibición alrededor de los pocillos

Tabla XXXV. Efecto sobre la pigmentación de EGB de hidrolizados tripticos de Extracto de Levadura.

Hidrolizados de Exto. Levadura	PIGMENTACION		
	MB (0,5% PP3)	MB (1% PP3)	MB (2,5% PP3)
Extracto de Levadura 10%	Sin efecto	Inhibe (###)	Inhibe (###)
Exto. Levadura 10% pH=7,8			
Exto. Levadura + tripsina *			
Exto. Levadura + tripsina **			
Solución tripsina 2,5%	Sin efecto	Sin efecto	

Medios: MB (2'5% Proteosa Peptona), MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 1%) y MB (disminuyendo la concentración de PP3 al 0'5%).

*: Tripsina inactivada rápidamente tras su adición **: Tripsina inactivada tras 40 horas de actuación enzimática

###, ##, #: grados de inhibición del pigmento según el tamaño del halo de inhibición alrededor de los pocillos

4.4. ESTUDIO DEL SUERO COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION DE *S.AGALACTIE*.

4.4.1. Actividad del Suero de caballo (SR-35 Oxoid)

La presencia de suero de caballo en el Medio Base junto con los demás componentes, nos permite la visualización de un pigmento naranja intenso. No obstante, la no incorporación de éste a medios de cultivo distribuidos en placas no conlleva disminución de la intensidad de la pigmentación aunque en los cultivos en tubo exista variabilidad de unas cepas a otras (Ver 4.1.2).

En medios sin Suero de caballo, se observa un halo de activación del pigmento alrededor de aquellos pocillos en que éste se adiciona, siendo activo a concentraciones proteicas del 1% (++) , 0,5% (++) y 0,25% (+) (incorporando 100 μ l a pocillos); cuando se adicionan 100 μ l de suero con un contenido proteico del 0,12% se observa un halo muy débil de activación (+/-).

Consideramos, como control de pigmentación en el modelo experimental de placas con pocillos (Medio Base sin Suero), la incorporación de 100 μ l de suero de caballo que proporciona un intensidad de pigmentación de ++ cruces.

4.4.2. Actividad del plasma humano, sueros de diferentes procedencias y sus fracciones sobre la pigmentación de EGB.

El plasma humano puede reemplazar al suero de caballo como constituyente del Medio Base a la misma concentración de éste, ya que permite la producción de pigmento naranja intenso tanto en los cultivos en placas como en tubos. De igual modo, su incorporación a pocillos produce un halo de activación del pigmento semejante al producido por el suero.

Suero humano, ovino, vacuno y de conejo, todos al 5% en sustitución del suero de caballo que incorpora la formulación original del MB, producen un pigmento naranja intenso en los cultivos en placas y tubos así como un halo de potenciación del pigmento en el Medio Base sin Metotrexato y sin Suero y en el Medio Base en que se elimina únicamente el Suero.

La sustitución de suero de caballo por suero fetal bovino, no conlleva formación de pigmento en los cultivos en tubos ni activación de la producción de pigmento por este microorganismo en el modelo experimental de placas con pocillos.

Hemos mencionado, que incorporando a pocillos (100 μ l) de suero de caballo a una concentración proteica del 0,12%, éste muestra una muy ligera activación del

pigmento (+/-). El suero bovino y el suero humano son algo más activos a una concentración proteica de 0,12%, por lo que consideramos por comparación de las intensidades de los halos de activación que se forman alrededor de los pocillos que presentan una actividad doble respecto al suero de caballo; el suero ovino es de 2-4 veces más activo que el suero de caballo y el suero de conejo aproximadamente 4 veces más activo que este último.

Independientemente de la procedencia de la fracción albúmina del suero (bovina, humana, de huevo), ésta no es capaz de potenciar la formación de pigmento cuando se incorporan a medios de cultivo en sustitución de suero. Tampoco, se ha podido demostrar en ellas, activación del pigmento mediante bioautografía.

Por el contrario, para la fracción globulínica se obtienen diferentes resultados ya que, Glogama^R, Gamma-Venin^R muestran halo de potenciación del pigmento alrededor de los pocillos en que se adicionan frente a Endobulin^R que no activa la pigmentación. La α_2 -macroglobulina muestra activación del pigmento mientras que los inhibidores proteicos, Aprotinina (Trasylo^R) y α_1 -Proteasa Inhibidor (Prolastin^R) son inactivas sobre la pigmentación.

Como proteína de elevado peso molecular, hemos ensayado la Tiroglobulina resultando ésta inactiva sobre la pigmentación.

4.4.4. Actividad de Suero humano sobre la formación de pigmento en EGB

Ultrafiltración de Suero

Solamente los ultrafiltrados con pesos moleculares < 300.000 daltons y < 100.000 daltons, producen un halo de activación del pigmento alrededor de los pocillos en que se incorporan; las fracciones retenidas mediante ultrafiltración con membranas de NMWC 300.000 y 100.000, no actúan como potenciadores de la pigmentación de EGB (Tabla XXXVI).

Tabla XXXVI. Actividad de diversas fracciones del Suero obtenidas mediante Ultrafiltración sobre la producción de pigmento por EGB

FRACCIONES DE SUERO	PIGMENTACION	
	MB sin MTX sin Suero	MB sin Suero
Retenido (NMWC 300.000)	Sin efecto	
Ultrafiltrado (NMWC 300.000)	Activa (++)	Activa (++)
Retenido (NMWC 100.000)	Sin efecto	
Ultrafiltrado (NMWC 100.000)	Activa (++)	Activa (++)
Ultrafiltrado (NMWC 30.000)	Sin efecto	
Ultrafiltrado (NMWC 10.000)		

Medios: Medio Base sin Metotrexato sin Suero y MB sin Suero

Medio Base: Proteosa Peptona 2'5%, Almidón 2%, Suero de caballo 5%, Glucosa 0'25%, 0'06M Na₂PO₄H, 0'05M MOPS, 0'1% piruvato sódico, 0'2% Sulfato de Magnesio, 0'6 µg/ml de metotrexato, 1% agar.

++,+,+: grados de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor de los pocillos.

Actividad del sobrenadante del suero obtenido por coagulación

El sobrenadante de suero obtenido tras el calentamiento a ebullición de éste y posterior centrifugación, no presenta actividad potenciadora del pigmento cuando se incorpora a pocillos con Medio Base sin Metotrexato y sin Suero o con Medio Base sin Suero.

Hidrolizados enzimáticos de Suero

Como podemos observar en la Tabla XXXVII, los digestos pépticos de suero de caballo, siguen mostrando actividad potenciadora de la pigmentación de EGB, aún después de un tiempo de actuación enzimática de 40 horas.

Tabla XXXVII. Actividad de hidrolizados pépticos de suero a diferentes tiempos de hidrólisis sobre la formación de pigmento por EGB.

Hidrolizados pépticos de Suero	PIGMENTACION	
	MB sin MTX sin Suero	MB sin Suero
Suero pH=2	Activa (+)	Activa (++)
Suero pH=2 + pepsina (0h)*	Activa (+)	Activa (++)
Suero pH=2 + pepsina (2h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=2 + pepsina (14h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=2 + pepsina (21h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=2 + pepsina (40h)	Activa (+)	Activa (+)

Medios: MB sin Metotrexato y sin Suero y MB sin Suero

*: pepsina inactivada rápidamente tras su adición mediante modificación del pH de 2 a 7;

(2h, 14h, 21h, 40h): tiempos de actuación del enzima antes de su inactivación.

+++, ++, +: grados de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor de los pocillos

Los hidrolizados trópticos del suero, al igual que los pépticos conservan el efecto potenciador del pigmento, mostrado por el suero completo (Tabla XXXVIII).

Tabla XXXVIII. Actividad de hidrolizados trópticos de Suero a diferentes tiempos de hidrólisis sobre la producción de pigmento por *S.agalactiae*

Hidrolizados Trópticos de Suero	PIGMENTACION	
	MB sin MTX sin Suero	MB sin Suero
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺	Activa (++)	Activa (++)
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺ + tripsina (0h)*	Activa (+)	Activa (++)
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺ + tripsina(2h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺ + tripsina(14h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺ + tripsina(21h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero pH=7,8 20mM Ca ²⁺ + tripsina(40h)	Activa (+)	Activa (+)
Suero + Inhibidor de Tripsina (Soja)	Sin efecto	Sin efecto

Medio: MB sin Metotrexato y sin Suero y MB sin Suero

*: tripsina inactivada rápidamente tras su adición mediante adición de cantidad suficiente de inhibidor de soja;

(2h, 14h, 21h, 40h): tiempos de actuación del enzima antes de su inactivación.

+++, ++, +: grados de activación del pigmento según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor de los pocillos

Diálisis del Suero

Tras la diálisis de suero frente a tampón fosfato 0,15M pH=7,4 (Ver 3.6.4.), se observa un efecto activador de la producción de pigmento en pocillos que incorporan la fracción retenida en la membrana de diálisis y ningún efecto en el dializado.

Fracciones de suero de caballo obtenidas mediante precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Como se refleja en la tabla XXXIX, se encontró actividad biológica potenciadora de pigmento en aquellos pocillos que incorporaban los sobrenadantes obtenidos mediante el empleo de saturaciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ del 20%, 30% y 40% y en los sedimentos obtenidos mediante una saturación del 30%, 40% y 50%. El empleo del Medio Base sin Suero mejora la visualización del efecto activador de estas fracciones frente al del Medio Base sin Metotrexato y sin Suero.

La incorporación de las soluciones de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ a los diferentes grados de saturación en los pocillos de estos mismos medios no mostró efecto activador ni inhibidor del pigmento.

4.4.4. Actividad de otros fluidos biológicos sobre la producción de pigmento por EGB.

Todos los líquidos ensayados (Líquidos ascíticos, sinoviales, de diálisis peritoneal, pleurales) a excepción de los LCR en los que la actividad sobre la producción de pigmento es variable, muestran activación de la producción de pigmento, mostrando halos de potenciación de éste alrededor de los pocillos que los incorporan.

Tabla XXXIX. Efecto sobre la formación de pigmento de EGB de las fracciones del suero obtenidas mediante precipitación con $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

FRACCIONES DE SUERO	PIGMENTACION	
	MB sin MTX sin Suero	MB sin Suero
Suero Humano	Activa (++)	Activa (++)
Sedimento 20% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Sin efecto	Sin efecto
Sobrenadante 20% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sedimento 30% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sobrenadante 30% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sedimento 40% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sobrenadante 40% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sedimento 50% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Activa (+)	Activa (++)
Sobrenadante 50% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$	Sin efecto	Sin efecto
$\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 20% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 30% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 40% Sat. $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ 50% Sat.	Sin efecto	Sin efecto

Medios: MB sin Metotrexato y sin Suero y MB sin Suero

§ Sat.= § Saturación en $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

+++, ++, +: grado de activación según el tamaño e intensidad del halo formado alrededor del pocillo

DISCUSSION

5. DISCUSION

La producción de un pigmento anaranjado en determinados medios de cultivo es una característica específica de los estreptococos β -hemolíticos del grupo B, que ha adquirido una enorme importancia debido principalmente a que puede servir como base en su identificación presuntiva (Fallon, 1974; Noble et al., 1983).

Se conocen diversos medios de cultivo en los que puede ponerse de manifiesto esta capacidad para producir pigmento de *Streptococcus agalactiae* (Islam, 1977; de la Rosa et al., 1983; Reardon et al., 1984; de la Rosa et al., 1992a). Las formulaciones de éstos han ido evolucionando, pasando de unos medios en los que se observaba un pigmento amarillento a otros en los que se ha conseguido una pigmentación naranja intensa que la hace fácilmente detectable, mejorando la visualización del pigmento en cepas poco pigmentadas y por tanto, la sensibilidad y disminuyendo el tiempo necesario para su detección.

La utilización de estos medios de diagnóstico rápido permite la identificación precoz de mujeres candidatas a profilaxis intraparto o de neonatos que pueden desarrollar infección por este microorganismo (Fallon, 1974; Islam, 1977; de la Rosa et al., 1983; Reardon et al., 1984; Richardson et al., 1987; Wang et al., 1988; de la Rosa et al., 1992a).

Existen pocos estudios realizados con el fin de determinar los componentes necesarios en estos medios de cultivo y los factores que condicionan la aparición de esta pigmentación en *Streptococcus agalactiae*, destacando entre ellos los llevados a cabo por Islam (Islam, 1977), De la Rosa (de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1990a; de la Rosa et al., 1990b; de la Rosa et al., 1992a) y Tapsall (Tapsall, 1986; Tapsall, 1987a)

5.1. INFLUENCIA DE LA COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO Y DE LAS CONDICIONES DE INCUBACION SOBRE LA FORMACION DE PIGMENTO POR *STREPTOCOCCUS AGALACTIAE*

Nuestros resultados (Ver 4.1.2.) indican que algunos de los componentes del medio de cultivo utilizado como base en nuestras experiencias, influyen de una forma especial en la formación y detección de pigmento de *Streptococcus agalactiae*, mientras que otros, solamente intervienen mejorando la calidad final de los medios de cultivo.

Como componentes que influyen en la pigmentación de EGB destacamos: **Almidón, Suero, fosfatos, Proteosa Peptona y Metotrexato**, no hablamos de componentes indispensables o esenciales en la formación de pigmento, porque si bien, algunos de ellos podrían considerarse como tales cuando se pretende conseguir una intensa pigmentación, ésta es posible en su ausencia aunque con una intensidad menor, lo que en algunos casos dificulta la detección del pigmento y prolonga el tiempo de incubación necesario antes de su visualización. En este aspecto, hemos de mencionar la incorporación de almidón al medio de cultivo, ya que en presencia del resto de los componentes lleva a la visualización de un pigmento naranja intenso, pero en medios en los que éste no se adiciona, si bien, es posible una pigmentación de tonalidad amarillenta en la superficie de placas de cultivo, no se observa pigmento en medios sembrados en profundidad (cultivo en tubos) (Merritt and Jacobs, 1976).

El suero, tampoco es un componente indispensable en la formulación, puesto que medios que no lo incorporan son capaces de apoyar la producción de pigmento por este microorganismo (Sukroongreung et al., 1984).

Por otra parte, la adición de inhibidores del folato mejora indudablemente la pigmentación de EGB (de la Rosa et al., 1983; Schaufß et al., 1985; Tapsall, 1987; de la Rosa et al., 1990b), aunque en medios en que éstos no se adicionan también es posible la visualización del pigmento (Fallon, 1974; Islam, 1977; Noble et al., 1983; Reardon et al., 1984).

Proteosa Peptona, merece también un especial interés debido a la falta de crecimiento del microorganismo en medios carentes de ella y a la no visualización de pigmento hasta que no se alcanza una determinada concentración de este hidrolizado en el medio.

Totalmente diferente a los anteriores es el caso de la adición de fosfatos al medio de cultivo, ya que su eliminación se asocia a la pérdida completa de pigmento en el medio, hecho observado en experiencias de otros autores (Noble et al., 1983; de la Rosa et al., 1983).

Está claro, que cada uno de los componentes mencionados actúa de algún modo favoreciendo la formación y/o detección del pigmento en EGB y que la interacción de todos ellos nos permite obtener medios de cultivo en los que se observa una pigmentación óptima. No existe pues, un solo componente responsable de la formación y visualización del pigmento, justificando ello los resultados detallados en la Tabla X (pág. 104).

Además de la influencia de la composición del medio de cultivo en la formación de pigmento, es interesante resaltar, el efecto de las condiciones de incubación en la formación de éste.

Tradicionalmente, se pensaba que para la detección de pigmento eran necesarias condiciones de incubación anaerobias, sin embargo nuestros resultados apoyan la formación de pigmento en aerobiosis. Este hecho fue mencionado por Merritt and Jacobs (1976) utilizando Agar Columbia y posteriormente por otros autores (Reardon et al., 1984; de la Rosa et al., 1992a). No obstante, existen diferencias en los requerimientos atmosféricos para producción de pigmento dependiendo del modo de crecimiento del microorganismo (en superficie o en profundidad).

En general, y coincidiendo con experiencias anteriores (de la Rosa et al., 1992a) podemos decir, que la pigmentación producida por colonias que crecen en la superficie de placas de cultivo es mucho más intensa tras incubación anaerobia, no existiendo diferencias en la pigmentación observada en atmósfera aerobia o anaerobia cuando el crecimiento se produce en el interior del medio de cultivo. En este último

caso, destacamos también la uniformidad de la pigmentación en todo el medio, no viéndose afectada ésta por las posibles diferencias atmosféricas creadas en el interior del medio de cultivo.

5.2. ALMIDON COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION DE *S. AGALACTIAE*

Ya en 1923, Durand y Giraud apuntaron la importancia del almidón como constituyente de medios de cultivo destinados a producción de pigmento por EGB (Fallon, 1974), por lo que en años sucesivos, este componente se ha venido incorporando a las diferentes formulaciones diseñadas con esta finalidad (Islam, 1977; de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1992a).

Nuestros resultados sugieren como hemos comentado anteriormente, que el almidón no puede considerarse un componente indispensable en medios de cultivo para pigmentación de EGB; no obstante, sí hay que considerarlo como tal, cuando no nos referimos meramente al hecho de producción de pigmento sino a la visualización de una pigmentación óptima. En este último sentido, el almidón es indispensable ya que su eliminación del medio de cultivo lleva a la desaparición del pigmento en medios sembrados en profundidad o a un cambio en la tonalidad y disminución de la intensidad del pigmento cuando el crecimiento se produce en la superficie de placas de cultivo.

A pesar de la gran variedad de concentraciones de almidón incorporadas a los distintos medios de cultivo diseñados para poner de manifiesto la pigmentación de EGB (Fallon, 1974; Merritt and Jacobs, 1978; de la Rosa et al., 1983; Reardon et al., 1984; Islam, 1977; de la Rosa et al., 1992a), no encontramos, a diferencia de otros autores (Noble et al., 1983; Reardon et al., 1984), gran influencia de ésta en la formación de pigmento, ya que empleando almidón al 2% conseguimos un pigmento naranja intenso semejante al obtenido a concentraciones finales en el medio

del 1% y del 0,5% (Tabla XII, pág. 109). Recientes estudios, indican que concentraciones mayores a éstas solamente conllevan una menor transparencia del medio de cultivo sin afectar a la intensidad de pigmentación (de la Rosa et al., 1992a).

Esta discrepancia podría explicarse considerando las diferencias existentes entre los diversos medios para pigmentación utilizados, ya que si bien algunos autores indican que a medida que se incrementa la concentración de almidón en el medio de cultivo incrementa la intensidad de pigmentación (Reardon et al., 1984; Richardson et al, 1987), el medio de cultivo base utilizado en nuestras experiencias difiere en su formulación con respecto a los utilizados por otros autores, pudiendo incluir componentes que permitan una intensa pigmentación incorporando menores concentraciones de almidón.

Se ha descrito (de la Rosa et al., 1983), la importancia del tipo y grado de hidrólisis del almidón empleado en la elaboración de estos medios de cultivo, aunque nuestras experiencias, no muestran diferencias significativas entre los almidones de diferentes procedencias ni tampoco en los almidones de igual origen que difieren en su grado de hidrólisis; este último hecho, posiblemente pueda explicarse porque el alcance de la hidrólisis en éstos no haya sido suficiente como para poder influir en la visualización del pigmento.

Por otra parte, hemos comprobado que hidrolizados de almidón a diferentes tiempos de actuación del enzima β -amilasa y por consiguiente, con distintos grados de hidrólisis producen una disminución gradual del pigmento conforme aumenta el tiempo y grado de hidrólisis, observándose al incorporar hidrolizados completos de almidón por acción de este enzima a medios de cultivo, un pigmento ligeramente amarillento semejante al producido por EGB en medios carentes de almidón. La adición a medios de cultivo de almidón junto con los hidrolizados enzimáticos de éste, restablece la pigmentación naranja del microorganismo aunque con una intensidad menor que la observada cuando se incorpora solamente almidón. Este hecho es fácilmente explicable por el elevado contenido en maltosa suministrado con el hidrolizado y la disminución del pH por acidificación durante el crecimiento (Topley and Wilson's, 1975; Tapsall, 1986).

A primera vista y debido a que medios sin almidón satisfacen el crecimiento de EGB, no podemos pensar en que éste posea una función nutricional, pero sin embargo, no podemos descartar esta posibilidad ya que en medios que no incorporan carbohidratos (Medio Base sin glucosa y sin almidón) el tamaño colonial se encuentra disminuído en relación a medios que incluyen uno de ellos o bien ambos. Esto significaría que, en presencia de glucosa los microorganismos utilizarían ésta pero que en su ausencia podrían utilizar el almidón, por lo que éste también actuaría como nutriente.

Cuando la incorporación de almidón al medio pretende esta finalidad, éste puede reemplazarse por polisacáridos, productos de su degradación y por la mayoría de los carbohidratos, ya que casi todos los ensayos con alguna excepción, permiten un crecimiento comparable al de éste.

Independientemente de este efecto promotor del crecimiento, es indudable que el almidón posee un efecto activador de la pigmentación, como mencionan algunos autores y lo sugieren otros, tras su continua incorporación a lo largo de los años a medios diseñados para pigmentación de este microorganismo (Reardon et al., 1984; de la Rosa et al., 1983; Fallon, 1974; Rosa et al., 1992a).

Nuestras experiencias indican que almidón, en su papel de activador en la pigmentación de *S.agalactiae*, no puede ser sustituído en el medio de cultivo por ningún otro carbohidrato aunque sí por una de sus fracciones constituyentes.

Medios de cultivo que incorporan la fracción lineal -amilosa- en sustitución de almidón proporcionan una intensidad de pigmento semejante a la de medios que incluyen éste. Sin embargo, la inclusión de amilopectina en sustitución de almidón produce un pigmento anaranjado, no comparable en intensidad ni tonalidad al formado por almidón y la fracción lineal de éste.

Esta capacidad de amilosa para inducir la visualización del pigmento unido a su gran capacidad absorbente y a su tendencia a formar una estructura helicoidal en solución acuosa (Pazur, 1965), puede sugerir que sea ésta la fracción del almidón responsable de la visualización del pigmento.

Las experiencias de Tapsall (1986) indican que albúmina puede actuar como molécula fijadora del pigmento, pero que en su presencia se detecta pigmento con 1 solo pico de absorción (415 nm) en contraste con el espectro de absorción del pigmento producido en medios con almidón que es de 4 picos.

Nuestros resultados sugieren que la sustitución de almidón por albúmina en medios de cultivo para pigmentación, produce un pigmento amarillento similar al que se produce en medios sin almidón, el cual correspondería al pigmento de 1 solo pico de absorción descrito por Tapsall (Tapsall, 1986). Así mismo, hemos observado en nuestras experiencias, una mayor intensidad de pigmento en el Medio Base que en este mismo medio adicionado de albúmina, lo que podría explicarse porque albúmina sea capaz de ligar el pigmento pero incapaz de retenerlo en su forma de 4 picos de absorción que es la forma visible de color naranja-rojizo. Por todo ello, consideramos que almidón no puede reemplazarse por albúmina en su función potenciadora de la visualización del pigmento aunque no descartamos el hecho que ésta actúe como molécula fijadora del pigmento, tal y como apunta Tapsall (1986).

Quizá el hallazgo más interesante en relación al componente almidón sea la concordancia encontrada entre la capacidad de visualización del pigmento y la capacidad para formar complejos con yodo. La correlación entre ambos está apoyada por varios hechos:

- Ninguno de los carbohidratos ensayados es capaz de producir el típico complejo azul intenso manifestado por soluciones acuosas de almidón tras la adición de yodo (Foster, 1965; Greenwood, 1956; Wolfrom, 1965; Whistler, 1965) ni inducir la pigmentación anaranjada en medios de cultivo.

- Amilosa en solución acuosa produce un complejo de color azul-violeta con una solución I_2/IK (Foster, 1965); el complejo formado por amilopectina es de tonalidad muy diferente y, solamente la primera es capaz de inducir la formación de pigmento con una intensidad similar a la de almidón.

- Disminución en la visualización del pigmento al incorporar hidrolizados parciales de almidón con β -amilasa a medios de cultivo al mismo tiempo que disminuye la intensidad de la reacción producida con yodo.

- Desaparición del pigmento en medios que incorporan hidrolizados completos de almidón con β -amilasa y pérdida en éstos de la capacidad de formar complejos coloreados con yodo.

Por todo esto, podemos sugerir que la visualización del pigmento en medios de cultivo que incorporan almidón está ligada a la estructura de éste. De modo que, el almidón actúa fijando y estabilizando el pigmento, análogamente a lo que ocurre con el yodo (Greenwood, 1956), haciendo posible su retención en la forma que presenta 4 picos de absorción que es fácilmente visible y que la ruptura enzimática del almidón y por tanto de su estructura condicionaría la inestabilidad del pigmento y su degradación, impidiendo la visualización de éste como pigmento naranja-rojizo.

Los resultados de este estudio corroboran las observaciones de otros investigadores (Tapsall, 1986; Merrit and Jacobs, 1978) respecto a que el pigmento desarrollado en medios que incorporan almidón presenta 4 picos de absorción, concretamente a 525 nm, 485 nm, 460 nm y 440 nm, longitudes de onda idénticas a las descritas por Tapsall en 1986; en cambio y aunque coincidiendo en que en medios carentes de almidón, se produce en el espectro de absorción la desaparición de los picos mencionados, no obtenemos resultados superponibles en lo que respecta al pico de absorción a 415 nm descrito por estos mismos autores.

A su vez, nuestros resultados indican una degradación del pigmento de 4 picos observado cuando EGB crece en el Medio Base, a un pigmento de un solo pico de absorción a 420 nm, tras adición de β -amilasa.

Por otra parte y puesto que, la variación de la composición del medio de cultivo por eliminación de metotrexato y suero, manteniendo el almidón no modifica el espectro de absorción del pigmento, sugerimos que almidón es el componente responsable de la aparición de estos picos.

5.3. PROTEOSA PEPTONA COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION

Proteosa Peptona, igual que almidón ejerce dos funciones en medios de cultivo para pigmentación de EGB: por un lado, una función nutritiva y por otro, una función activadora del pigmento. La primera de ellas es obvia, ya que su incorporación es indispensable para el desarrollo de EGB y sin ella no se produce crecimiento (salvo que se incorpore otra fuente adecuada de aminoácidos), aunque la cantidad que se requiere para satisfacer estas necesidades nutricionales es menor que la necesaria para inducir la formación de pigmento.

Esta dependencia nutricional de Proteosa Peptona para el crecimiento de EGB, dificulta el diseño de un medio de cultivo para el estudio de su función potenciadora del pigmento, ya que de algún modo es necesario el aporte de ésta para que se produzca un crecimiento adecuado de *S.agalactiae*. Este hecho se ha solventado elaborando diversos medios de cultivo en los que se incorpora este hidrolizado a concentraciones que satisfacen los requerimientos nutricionales del microorganismo y en los que dependiendo de la cantidad incorporada se obtienen diferentes grados de pigmentación, siendo posible por ello, detectar la actividad potenciadora así como inhibidora producida por los diversos compuestos ensayados.

En medios de cultivo que incluyen en su composición un 2,5% de Proteosa Peptona (Medio Base) se produce una pigmentación intensa (siempre que mantengamos los demás componentes del Medio Base) y cuando disminuimos la concentración de ésta se produce una disminución considerable en la intensidad del pigmento, sin afectar al crecimiento de EGB. Este hecho, fue observado por Merrit and Jacobs en 1976, al tomar como base para el diseño de un medio de cultivo para pigmentación de EGB, un medio en el que era posible el crecimiento pero no la producción de pigmento y en el que únicamente con el incremento en la concentración de Proteosa Peptona era posible la visualización de éste (Merrit and Jacobs, 1976a). Probablemente, esto pueda explicarse por la existencia en este hidrolizado proteico de una o varias sustancias necesarias para la formación de

pigmento y que éstas deban encontrarse en una determinada concentración para ejercer su función activadora de la formación del pigmento.

Cada uno de los medios diseñados como modelo para el estudio de Proteosa Peptona (PP3) respalda el crecimiento de EGB, pero posee distinta finalidad dependiendo de la cantidad adicionada de ésta.

Medios que incorporan tan solo un 0,5% Proteosa Peptona, satisfacen el crecimiento de EGB pero no respaldan la producción de pigmento, siendo por ello este diseño útil, para determinar la presencia de compuestos activadores de la pigmentación. Medios con 2,5% de este hidrolizado (Medio Base) sí son capaces de apoyar la pigmentación y por lo tanto son útiles para detectar compuestos que actúan como inhibidores de la producción de pigmento.

La utilización de una concentración de Proteosa Peptona intermedia entre ambas (1%) apoya el crecimiento y la pigmentación de EGB, siendo ésta última menos intensa que la producida en medios con 2,5% de este componente, permitiendo por ello este diseño, detectar compuestos tanto activadores como inhibidores de la pigmentación.

Está claro, y así lo apoyan experiencias de otros autores (de la Rosa et al., 1983) que Proteosa Peptona puede sustituirse por otros hidrolizados proteicos en lo que respecta a su función nutritiva y prueba de ello, es el incremento del crecimiento detectado alrededor de pocillos que incorporan hidrolizados proteicos diferentes a Proteosa Peptona N°3 (PP3) en medios de cultivo que no incorporan ésta (Tablas XXIV, XXV, XXVI).

Por otro lado, todos los hidrolizados proteicos ensayados pueden apoyar el crecimiento de este microorganismo, aunque no todos ellos pueden reemplazar a la Proteosa Peptona N°3 en su actividad potenciadora del pigmento; concretamente solo Peptamina (Difco) y Proteosas Peptonas (Difco) son capaces de tal función. Estos hidrolizados comerciales activos en la pigmentación son obtenidos igual que PP3 mediante digestión con pepsina, aunque no todos los hidrolizados pépticos potencian la formación de pigmento, como es el caso de Proteosa Peptona (Oxoid) y Peptona

(Difco), por lo que han de influir otros factores como origen y calidad proteica, método de obtención, grado de hidrólisis, etc.

Es lógico, que la proteína de origen influya en la capacidad potenciadora del pigmento manifestada por el hidrolizado. El método de obtención también afecta a la posible capacidad activadora del hidrolizado proteico, como se deduce de las diferencias existentes entre los hidrolizados ácidos e hidrolizados enzimáticos y dentro de estos últimos los obtenidos con diferentes enzimas. Sin embargo, ante hidrolizados de similar procedencia (peptonas de carne), obtenidos mediante tratamiento con pepsina, el grado de hidrólisis parece ser fundamental ya que los hidrolizados que activan la pigmentación (Peptamina y Proteosas Peptonas -Difco-) incluyen en su composición proteínas de elevado peso molecular, pocos péptidos y también pocos aminoácidos libres, frente a los hidrolizados que no actúan como potenciadores (Peptona -Difco-) que poseen un elevado contenido en péptidos y aminoácidos y solamente una pequeña proporción de proteosas y compuestos nitrogenados más complejos.

En relación a las diferencias entre los enzimas usados para obtener un hidrolizado, es interesante el que contrariamente a los hidrolizados pépticos, prácticamente todos los hidrolizados proteicos comerciales ensayados, obtenidos mediante tratamiento con tripsina, independientemente de la proteína de origen (Triptona -Difco-, Hidrolizado de Lactoalbúmina -Oxoid-, Triptosa -Oxoid-) no presentan efecto activador de la pigmentación.

Mediante bioautografía, hemos determinado que la tripsina por sí misma no actúa inhibiendo el pigmento ya formado, y que los digestos de Proteosa Peptona N°3 obtenidos mediante el tratamiento con esta enzima pierden su capacidad activadora de la pigmentación, resultando incluso algo inhibidores.

Resultados semejantes a los obtenidos en nuestras experiencias fueron hallados por Haug and Soderlung en 1977, al comprobar que en caldos de cultivo preincubados con tripsina antes de su inoculación no se producía pigmento; ambos hechos podrían explicarse suponiendo que el enzima actúa sobre los péptidos o sustancias responsables de la formación del pigmento destruyéndolos o bien porque

en su proceso de actuación se formen compuestos inhibidores.

Por el contrario, los digestos de Proteosa Peptona N°3 obtenidos mediante tratamiento con pepsina mantienen el efecto activador del hidrolizado de origen, lo que podría explicarse por no actuación de este enzima sobre los componentes responsables de la formación del pigmento o bien a no formación de inhibidores durante el proceso de actuación de la hidrólisis péptica.

Nuestros resultados confirman experiencias anteriores que indicaban que la fracción de Proteosa Peptona responsable de la producción de pigmento es termoestable, dializable y de peso molecular menor de 10.000 daltons (de la Rosa et al., 1990a). Así mismo, nuestros resultados delimitan algo más el peso molecular, ya que la fracción responsable del efecto activador de PP3 atraviesa una membrana de NMWC 1.000, por lo que en teoría debería tener un PM < 1.000 daltons, ya que no podemos olvidar las limitaciones impuestas por el método de obtención de estas fracciones (Harris, 1989).

Además de en todos estos hidrolizados, hemos tratado de demostrar actividad en otros componentes más simples como aminoácidos, vitaminas y ácidos nucleicos, encontrando que estos últimos muestran una ligera activación de la pigmentación.

Para el estudio de aminoácidos y vitaminas, hemos partido de mezclas de ellos, ensayando individualmente cada uno de los componentes incluidos en la mezcla ante la presencia de cualquier tipo de actividad en ésta, ya sea potenciadora o inhibidora. Hemos de resaltar que una mezcla constituida por los siguientes aminoácidos (arginina 6'32 g/l, cistina 1'42 g/l, histidina 2'1 g/l, isoleucina 2'63 g/l, leucina 2'63 g/l, lisina 3'65 g/l, metionina 0'75 g/l, fenilalanina 1'65 g/l, triptófano 0'51 g/l, treonina 2'38 g/l, tirosina 2'25 g/l y valina 2'35 g/l) mostró efecto activador del pigmento, aunque de ellos individualmente únicamente triptófano a la concentración mencionada y solo muy ligeramente fue capaz de activar la pigmentación.

Por el contrario, no se detectó actividad potenciadora en ninguna de las vitaminas ensayadas aunque sí reversión del pigmento en medios que incorporan un

1% de Proteosa Peptona N°3 (Difco) y un 2,5% de PP3 (Medio Base) en el caso de tiamina a una concentración de 0'1 g/l, no obstante la inhibición aportada por esta vitamina individualmente no coincide con la de la mezcla completa (biotina, pantotenato cálcico, cloruro de colina, ácido fólico, nicotinamida, piridoxal y tiamina, todos ellos a una concentración de 0'1 g/l, riboflavina 0'01 g/l e inositol 0'2 g/l), la cual denota una mayor actividad inhibidora.

En ambos casos aminoácidos y vitaminas, los componentes individuales no presentan igual actividad que el conjunto de ellos, por lo que posiblemente la actividad final de la mezcla se deba a la interacción de varios de ellos.

Entre los productos ensayados el extracto de levadura es uno de los que merecen mayor interés debido a su gran capacidad para revertir el pigmento. El alto contenido en vitaminas de este extracto, justificaría en parte su actividad inhibidora (debido a la presencia de tiamina). Decimos que, se justifica parcialmente ya que tras la destrucción de tiamina mediante autoclavado a pH alcalino (Litter, 1984) se mantiene el efecto inhibidor de la pigmentación.

La imposibilidad de delimitar el peso molecular del inhibidor junto con la persistencia de la actividad inhibidora del extracto tras la destrucción de la tiamina, podría apoyar la existencia en este extracto de diversos compuestos con esta actividad. Por otro lado, la no desaparición del efecto inhibidor por tratamiento enzimático (pepsina y tripsina), sugiere que podemos no encontrarlos ante péptidos sino ante componentes de otra naturaleza.

5.4. SUERO COMO CONSTITUYENTE DE MEDIOS DE CULTIVO PARA PIGMENTACION

El suero posee una función nutritiva, puesto que se observa un mayor tamaño colonial de EGB y se requiere menor tiempo de incubación para lograr el crecimiento tras su adición a medios de cultivo (Sukroongreung et al., 1984; de la Rosa et al., 1983); esta función del suero, es conocida desde hace muchos años y no se limita a

medios para pigmentación de EGB sino que es aplicable a casi todos los medios en que éste se encuentra como componente en la formulación.

A su vez, el suero es también un coadyuvante en la producción de pigmento de EGB, como puede determinarse mediante bioautografía así como con la mejora de la pigmentación cuando se adiciona a medios de cultivo sembrados en profundidad. Decimos esto último, puesto que el comportamiento de *S. agalactiae* en cuanto a producción de pigmento en la superficie de placas de cultivo, no depende de la adición de suero ya que medios con/sin suero presentan prácticamente la misma intensidad de pigmentación, mientras que en medios sembrados a sobrefusión la presencia de suero intensifica el pigmento en la mayoría de las cepas. Por ello, los resultados obtenidos en placas sembradas en superficie no son de utilidad en la búsqueda de análogos y sustitutivos del suero de caballo, y nos hemos basado únicamente en los datos obtenidos de medios de cultivo sembrados en profundidad (cultivos en tubos) o en los obtenidos utilizando el método bioautográfico, siendo ambos resultados coincidentes.

Quizá, esta mejora de la pigmentación conseguida al adicionar suero a medios sembrados en profundidad pueda justificarse, considerando la existencia de sustancias que actúen como hidrofobinas en suero y que modifican por tanto la interfase célula-medio de cultivo (Rosenberg and Doyle, 1990), favoreciendo la difusión del pigmento al medio.

Se ha descrito que algunos estreptococos poseen superficies externas hidrofóbicas y que diferentes agentes son capaces de modificar la hidrofobicidad de las paredes bacterianas (Rosenberg and Doyle, 1990). Es el caso del suero humano que inhibe la adhesión de estreptococos orales a la placa dental y de la albúmina de suero bovino y componentes hidrofóbicos presentes en saliva que inhiben la adhesión de estreptococos a tubos de poliestireno (Rosenberg and Doyle, 1990).

El diseño de un medio de cultivo para el estudio del suero no plantea el problema de la dependencia nutricional encontrado en Proteosa Peptona, pero debido a que en los medios sin suero sembrados en superficie se observa una pigmentación colonial que podríamos considerar óptima, es necesario eliminar algún componente

de la formulación que nos permita la observación de halos de activación al utilizar el modelo experimental de placas con pocillos.

La comparación de la pigmentación producida entre variantes del Medio Base, justifica la elección para el estudio del suero de medios en que se elimina el metotrexato junto con el suero ya que éstos proporcionan una ligera pigmentación amarillenta que permite la detección de activadores, utilizándose paralelamente un medio en el que se incorpora este componente y solamente se elimina el suero de la formulación para facilitar la detección de posibles inhibidores.

No conocemos el/los componentes del suero que influyen en la producción de pigmento, aunque sugerimos una naturaleza proteica al no encontrar actividad en el sobrenadante obtenido tras coagulación del suero; por otro lado, siguiendo activos los hidrolizados obtenidos mediante tratamiento con pepsina y tripsina, lo que nos lleva a pensar que si bien es un compuesto proteico, no sería atacado por estas enzimas o bien a dudar de esta naturaleza.

Es conocida la existencia de muchos inhibidores de proteasas en suero (Kaneko, 1989) que podrían impedir la actuación de estas enzimas, por lo que ésta podría ser también una explicación a este hecho.

El suero de caballo que es el incluido en la formulación original del medio puede reemplazarse por suero de conejo, vacuno, ovino, humano, actuando éstos del mismo modo que el primero e incluso con una mayor actividad que éste. El plasma humano también podría ser un sustituto eficaz en medios que no contienen suero.

El suero fetal bovino a diferencia de los anteriores, carece de efecto coadyuvante en la visualización del pigmento.

Aparte de la función nutricional del suero, uno de los motivos por los que éste se incluye en medios de cultivo, es por su capacidad de absorber materiales tóxicos, generalmente ácidos grasos (Bridson, 1978), hecho debido fundamentalmente a la fracción albúmina, por lo que si la formación de pigmento se relacionase con esta propiedad y en este medio concreto la incorporación de suero tuviese tal

finalidad, debería poder reemplazarse por albúmina produciéndose pigmento en presencia de ésta. Las experiencias demuestran que no son activas en la pigmentación las diferentes albúminas ensayadas aunque sí algunas globulinas. Este resultado habría que considerarlo con precaución, puesto que todas las globulinas que hemos empleado son inespecíficas y solamente difieren en el laboratorio de procedencia, por lo que las diferencias en actividad podrían explicarse en base a los distintos métodos de obtención y purificación utilizados en cada uno de ellos (Cabañas et al., 1991), condicionando esto la presencia de determinadas impurezas en algunas globulinas y no en otras; es por ello que, no podemos imputar la actividad intensificadora del pigmento a las globulinas en general, sino posiblemente a cualquier impureza unida a ellas.

De nuestras experiencias, deducimos que la fracción responsable de la activación del pigmento en el suero, es termolábil y de peso molecular mayor de 30.000 daltons. Quizá, este peso molecular no coincida con el que podríamos sospechar después de estudiar la actividad de las fracciones obtenidas mediante precipitación con sulfato amónico ya que al ser activo el precipitado obtenido mediante una saturación del 30%, indicaría que el peso molecular es algo mayor que el mencionado. Podríamos explicar este hecho, teniendo en cuenta que la precipitación no es selectiva y que proteínas de menor peso molecular pueden unirse a otras mayores y coprecipitar junto a éstas (Harris, 1989).

El efecto activador del pigmento demostrado por líquidos orgánicos, puede muy bien deberse al mismo componente responsable del efecto activador en suero y la escasa o variable actividad en líquidos cefalorraquídeos explicada por la generalmente baja concentración de éstos en proteínas y otros componentes.

5.5. HIPOTESIS FINAL

Basándonos en las experiencias de diversos autores (Merritt and Jacobs, 1978; Tapsall, 1986; de la Rosa et al., 1983; de la Rosa et al., 1992a) y en las propias de este trabajo, proponemos la siguiente hipótesis en relación a la producción de pigmento por *Streptococcus agalactiae*:

El pigmento se encuentra localizado en la membrana celular (Merritt and Jacobs, 1978), por lo que una vez formado éste para su visualización, ha de liberarse y difundir al medio de cultivo, pudiéndose por tanto actuar en diferentes puntos para conseguir optimizar la pigmentación.

Sabemos que, la glucosa es requerida para la formación y liberación del pigmento como fuente energética al tratarse éste de un proceso metabólico activo (Tapsall, 1986); que la presencia de Mg^{2+} favorece también su formación (Tapsall, 1986) y que, en general, la composición del medio de cultivo afecta a la detección de éste bien favoreciendo su formación o bien su liberación al medio de cultivo.

Probablemente, Proteosa Peptona actúa favoreciendo la producción de pigmento al proporcionar determinados péptidos o sustancias que intervienen en el proceso de formación.

El almidón o la fracción amilosa actúan como moléculas estabilizadoras o fijadoras del pigmento al quedar éste atrapado por la hélice del almidón de forma análoga a lo que ocurre con el yodo (Foster, 1965), contribuyendo de este modo a su retención en la forma que presenta 4 picos de absorción que es fácilmente visualizable. No conocemos ningún otro componente que actúe como fijador o estabilizador del pigmento en estas mismas condiciones siendo imprescindible la presencia de una molécula con esta propiedad una vez liberado éste para evitar su destrucción.

Desconocemos, la función que realiza el suero en medios de cultivo para pigmentación, aunque sugerimos que entre otras, podría actuar modificando la difusibilidad del pigmento al medio de cultivo posiblemente al modificar la interfase célula-medio (Rosenberg and Doyle, 1990) justificando de este modo, el que su

incorporación solamente intensifique la pigmentación del microorganismo cuando su crecimiento se produce en el interior del medio de cultivo.

Queda aún mucho por dilucidar sobre la pigmentación de EGB aunque las líneas de investigación existentes auguran resultados prometedores.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. *Streptococcus agalactiae* es capaz de producir pigmento en determinados medios de cultivo, siendo la composición de éstos determinante en su visualización. Destacamos como componentes que más influyen en la pigmentación de este microorganismo: almidón, suero, fosfatos, proteosa peptona e inhibidores del folato.

2. Existen diferencias entre los requerimientos atmosféricos para producción de pigmento dependiendo del modo de crecimiento del microorganismo (en superficie de placas de cultivo o en profundidad).

3. La incorporación de almidón al medio de cultivo favorece el crecimiento y la pigmentación de EGB.

En su función nutricional el almidón puede ser reemplazado por otros carbohidratos, no así en lo que respecta a la función activadora del pigmento en que solamente puede sustituirse por su fracción amilosa.

El almidón fija el espectro de absorción del pigmento determinando su presencia 4 picos de absorción (525 nm, 485 nm, 460 nm y 440 nm).

Existe una correlación entre la potenciación del pigmento producida por el almidón y su capacidad para complejar yodo, ya que a medida que disminuye ésta disminuye también la intensidad del pigmento producido por EGB.

4. La incorporación de Proteosa Peptona satisface necesidades nutricionales del microorganismo favoreciendo también la formación de pigmento.

La fracción de Proteosa Peptona responsable de la producción de pigmento es termoestable, dializable y atraviesa una membrana de NMWC 1.000.

Los hidrolizados pépticos de Proteosa Peptona mantienen la actividad intensificadora del pigmento a diferencia de los hidrolizados trópticos que producen reversión de éste.

El extracto de Levadura inhibe la formación del pigmento, en parte debido a su contenido en tiamina.

5. La incorporación de suero de caballo a medios de cultivo potencia la pigmentación de EGB pudiendo éste reemplazarse por plasma y sueros de otras procedencias (bovino, ovino, conejo, humano).

La fracción responsable de la producción de pigmento en suero es termolábil y de peso molecular mayor de 30.000 daltons.

BIBLIOGRAFIA

7. BIBLIOGRAFIA

ABER R. C., ALLEN N., HOWELL J. T., WILKINSON H. W., FACKLAM R. R. 1976. Nosocomial transmission of group B streptococci. *Pediatrics*; 58: 346-353.

AMMARI L. K., OFFIT P. A., CAMPBELL A. B. 1992. Unusual presentation of group B *Streptococcus osteomyelitis*. *Pediatr Infect Dis J*; 11: 1066-1067.

ANCONA R. J., FERRIERI P., WILLIAMS P. P. 1980. Maternal factors that enhance the acquisition of group B streptococci by newborn infants. *J Med Microbiol*; 13: 273-280.

ANTHONY B. F., CONCEPCION N. F. 1975. Group B *Streptococcus* in a General Hospital. *J Infect Dis*; 132: 561-567.

ANTHONY B. F., OKADA D. M. 1977. The emergence of group B streptococci in infections of the newborn infant. *Annu Rev Med*; 28: 355-369.

ANTHONY B. F., OKADA D. M., HOBEL C. J. 1978. Epidemiology of group B *Streptococcus*: Longitudinal observations during pregnancy. *J Infect Dis*; 137: 524-530.

ANTHONY B. F., OKADA D. M., HOBEL C. J. 1979. Epidemiology of the group B *Streptococcus*: Maternal and nosocomial sources for infant acquisitions. *J Pediatr*; 95: 431-436.

ANTHONY B. F., EISENSTADT R., CARTER J., KIM K. S., HOBEL C. J. 1981. Genital and intestinal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis*; 143: 761-766.

ANTHONY B. F. 1982. Carriage of group B streptococci during pregnancy: A puzzler. *J Infect Dis*; 145: 789-793.

ANTHONY B. F., CARTER J. A., EISENSTADT R., RIMER D. G. 1983. Isolation of group B streptococci from the proximal small intestine of adults. *J Infect Dis*; 147: 776.

ANTHONY B. F. 1985. Epidemiology of GBS in man. *Antibiot Chemother*; 35: 10-16.

BADRI M. S., ZAWANEH S., CRUZ A. C., MANTILLA G., BAER H., SPELLACY W. N., AYOUB E. M. 1977. Rectal colonization with group B Streptococcus: Relation to vaginal colonization of pregnant women. *J Infect Dis*; 135: 308-312.

BAKER C. J., BARRETT F. F. 1973a. Transmission of group B streptococci among parturient women and their neonates. *J Pediatr*; 83: 919-925.

BAKER C. J., CLARK D. J., BARRETT F. F. 1973b. Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl Microbiol*; 26: 884-885.

BAKER C. J., BARRETT F. F., GORDON R. C., YOW M. D. 1973c. Suppurative meningitis due to streptococci of Lancefield group B: A study of 33 infants. *J Pediatr*; 82: 724-729.

BAKER C. J., BARRETT F. F. 1974. Group B streptococcal infections in infants. *J Am Med Assoc*; 230: 1158-1160.

BAKER C. J., WEBB B. J., BARRETT F. F. 1976a. Antimicrobial susceptibility of group B streptococci isolated from a variety of clinical sources. *Antimicrob Agents Chemother*; 10: 128-131.

BAKER C. J., KASPER D. L. 1976b. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N Engl J Med*; 294: 753-756.

BAKER C. J. 1977a. Summary of the workshop of perinatal infections due to group B Streptococcus. *J Infect Dis*; 136: 137-152.

BAKER C. J., GOROFF D. K., ALPERT S., CROCKETT V. A., ZINNER S. H., EVRARD J. R., ROSNER B., McCORMACK W. M. 1977b. Vaginal colonization with group B Streptococcus: A study in college women. *J Infect Dis*; 135: 392-397.

BAKER C. J. 1979. Group B Streptococcal infections in neonates. *Pediatr Rev*; 1: 5-15.

BAKER C. J. 1980. Group B streptococcal infections. *Adv Intern Med*; 25: 475-501.

BAKER C. N., THORNSBERRY C., FACKLAM R. R. 1981. Synergism killing kinetics, and antimicrobial susceptibility of group A and B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 19: 716-725.

BAKER C. J. 1986. Group B streptococcal infection in newborn. Prevention at last? *N Engl J Med*; 314: 1702-1704.

BAKER C. J., RENCH M. A., EDWARDS M. S., CARPENTER R. J., HAYS B. M., KASPER D. L. 1988. Immunization of pregnant women with a polysaccharide vaccine of group B Streptococcus. *N Engl J Med*; 319: 1180-1185.

BAKER C. J., EDWARDS M. S. 1990. Group B Streptococcal infections, p.742-811. *In*: Remington J. S., Klein J. O. (eds), *Infectious disease of the fetus and newborn infant*. 3rd. ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia.

BARNHAM M. 1983. The gut as a source of the haemolytic streptococci causing infection in surgery of the intestinal and biliary tracts. *J Infect*; 6: 129-139.

BARTON L. L., FEIGIN R. D., LINS R. J. 1973. Group B beta hemolytic streptococcal meningitis in infants. *Pediatrics*; 82: 719-723.

BAYER A. S., CHOW A. W., ANTHONY B. F., GUZE L. 1976. Serious infections in adults due to group B streptococci. *Br Am J Med*; 61: 498-503.

BAYER A. S., MORRISON J. O., KIM K. S. 1982. Comparative in vitro bactericidal activity of cefonicid, ceftizoxime and penicillin against group B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 21: 344-348.

BeMILLER J. N. 1965. Organic complexes and coordination compounds of carbohydrates, p. 309-322. *In*: Whistler R. L., Paschall E. F., (eds), *Starch: Chemistry and technology*. Vol I. Aspects fundamental. Academic Press Inc. New York and London.

BENEDI V. J., HERVAS J. A. 1992. Bases moleculares de los serotipos de estreptococos del grupo B. *Enf Infec Microbiol Clin*; 10: 321-322.

BERKOWITZ K., REGAN J. A., GREENBERG E. 1980. Antibiotic resistance patterns of group B streptococci in pregnant women. *J Clin Microbiol*; 28: 5-7.

BEVANGER L., MAELAND J. A. 1979. Complete and incomplete Ibc protein fraction in group B streptococci. *Acta Pathol Microbiol Scand*; 87: 51-54.

BOYER K. M., GADZALA C. A., KELLY P. G., BURD L. C., GOTOFF S. P. 1981. Rapid identification of material colonization with group B streptococci by use of fluorescent antibody. *J Clin Microbiol*; 14: 550-556.

BOYER K. M., GADZALA C. A., BUERD L. I., FISHER D. E., PATON J. B., GOTOFF S. P. 1983a. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. I. Epidemiologic rationale. *J Infect Dis*; 148: 795-801.

BOYER K. M., GADZALA C. A., KELLY., BURD L.I., GOTOFF S. A. 1983b. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis*; 148: 802-809.

BOYER K. M., GADZALA C. A., KELLY P. D., GOTOFF S. A. 1983c. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. III. Interruption of mother-to-infant transmission. *J Infect Dis*; 148: 810-816.

BOYER K. M., GOTOFF S. P. 1985. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early onset infections. *Antibiot Chemother*; 35: 267-280.

BRIDSON E. Y. 1978. Natural and synthetic culture media for bacteria, p. 91-115. *In*: Recheigl M. (ed). *CRS Handbook Series in Nutrition and Food, Section G: Diets, Culture Media, Food Supplements, Vol III. Culture media for microorganisms and plants.* CRC Press, Inc. Cheveland, Ohio.

BRIDSON E. Y., BRECKER A. 1970. Design and formulation of microbial culture media, p. 229-295. *In*: Norris J. R., Ribbons D. W. (eds), *Methods in Microbiology.* Vol 3A. Academic Press, London.

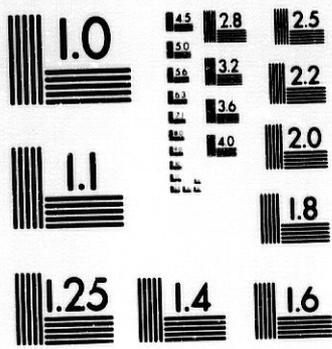
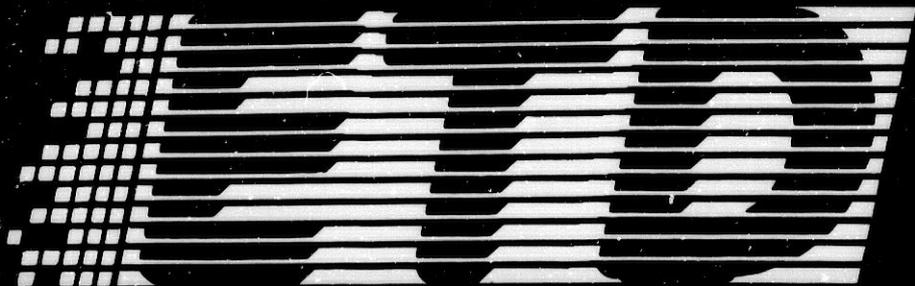
BROOK I. 1989. Inoculum effect. *Rev Infect Dis*; 11: 361-368.

CABAÑAS M. J., MONTORO J. B., JODAR R. 1991. Características técnicas de las inmunoglobulinas de uso intravenoso. *Ciencia Farmacéutica*; 1: 213-219.

CARAZO C. 1990. *Streptococcus agalactiae*: Biotipia y acción de diversos antimicrobianos en la dinámica de crecimiento. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

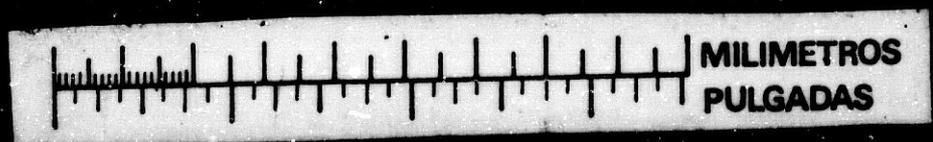
CHRISTENSEN P., KAHLMETER G., JONSSON S., KRONVALL G. 1973. New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. *Infect Immun*; 7: 881-88.

CHRISTENSEN K. K., CHRISTENSEN P., JULDORF F., PETTERSON I. 1978. Rectal colonization with group B streptococci: Relation to urogenital carriage. *Scand J Infect Dis*; 10: 291-293.



MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

1:24



BOYER K. M., GADZALA C. A., BUERD L. I., FISHER D. E., PATON J. B., GOTOFF S. P. 1983a. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. I. Epidemiologic rationale. *J Infect Dis*; 148: 795-801.

BOYER K. M., GADZALA C. A., KELLY., BURD L.I., GOTOFF S. A. 1983b. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. II. Predictive value of prenatal cultures. *J Infect Dis*; 148: 802-809.

BOYER K. M., GADZALA C. A., KELLY P. D., GOTOFF S. A. 1983c. Selective intrapartum chemoprophylaxis of neonatal group B streptococcal early-onset disease. III. Interruption of mother-to-infant transmission. *J Infect Dis*; 148: 810-816.

BOYER K. M., GOTOFF S. P. 1985. Strategies for chemoprophylaxis of GBS early onset infections. *Antibiot Chemother*; 35: 267-280.

BRIDSON E. Y. 1978. Natural and synthetic culture media for bacteria, p. 91-115. *In: Recheigl M. (ed). CRS Handbook Series in Nutrition and Food, Section G: Diets, Culture Media, Food Supplements, Vol III. Culture media for microorganisms and plants. CRC Press, Inc. Cheveland, Ohio.*

BRIDSON E. Y., BRECKER A. 1970. Design and formulation of microbial culture media, p. 229-295. *In: Norris J. R., Ribbons D. W. (eds), Methods in Microbiology. Vol 3A. Academic Press, London.*

BROOK I. 1989. Inoculum effect. *Rev Infect Dis*; 11: 361-368.

CABAÑAS M. J., MONTORO J. B., JODAR R. 1991. Características técnicas de las inmunoglobulinas de uso intravenoso. *Ciencia Farmacéutica*; 1: 213-219.

CARAZO C. 1990. *Streptococcus agalactiae*: Biotipia y acción de diversos antimicrobianos en la dinámica de crecimiento. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

CHRISTENSEN P., KAHLMETER G., JONSSON S., KRONVALL G. 1973. New method for the serological grouping of streptococci with specific antibodies adsorbed to protein A-containing staphylococci. *Infect Immun*; 7: 881-88.

CHRISTENSEN K. K., CHRISTENSEN P., JULDORF F., PETTERSON L. 1978. Rectal colonization with group B streptococci: Relation to urogenital carriage. *Scand J Infect Dis*; 10: 291-293.

CHRISTENSEN K. K., CHRISTENSEN P. 1985a. The R proteins. *Antibiot Chemother*; 35: 114-118.

CHRISTENSEN K. K., CHRISTENSEN P. 1985b. Clorhexidine for prevention of neonatal colonization with GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 296-302.

COLL P., CONDOM M J., MIRELIS B., AUSINA V., PRATS G. 1985. La susceptibilidad del trimetoprim-sulfametoxazol en la diferenciación de estreptococos. *Laboratorio*; 79: 287-292.

COOPER M D., KEENEY R. E., LYONS S. F., CHEATLE E. L. 1979. Synergistic effects of ampicillin-aminoglycoside combinations on group B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 15: 484-486.

CROPP C. B., ZIMMERMAN R. A., JELINKOVA J., AUERNHEIMER A. H., BOLIN R. A., WYRICK B. C. 1974. Serotyping of group B streptococci by slide agglutination fluorescence microscopy and microimmunodiffusion. *J Lab Clin Med*; 84: 594-603.

CUETO M. 1989. Aspectos epidemiológicos y microbiología de la infección por *Streptococcus agalactiae* en adultos. Tesis Doctoral. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

DARLING C. L. 1975. Standarization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield Group B) in clinical material. *J Clin Microbiol*; 1: 171-174.

DE LA ROSA M., VILLAREAL R., VEGA D., MIRANDA C., MARTINEZ-BROCAL A. 1983. Granada medium for detection and identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol*; 18: 779-785.

DE LA ROSA M., PEIS J., CARAZO C., CUETO M., GARCIA V. 1990a. Effect of culture medium components on *Streptococcus agalactiae* pigment-enhancing media. Program. Abstr. XI Lancefield International Symposium on streptococci and streptococcal diseases, Siena (Italia). Abstr. 171.

DE LA ROSA M., CARAZO C., PEIS J., CUETO M. AND GARCIA V. 1990b. Pigment enhancing effect of folate antagonists on group B streptococci. Program. Abstr. XI Lancefield International Symposium on streptococci and streptococcal diseases, Siena (Italia). Abstr. 172.

DE LA ROSA M., PEREZ M., CARAZO C., PAREJA L., PEIS J. I., HERNANDEZ F. 1992a. New Granada medium for detection and identification of group B Streptococci. *J Clin Microbiol*; 30: 1019-1021.

DE LA ROSA M., PEREZ M., CARAZO C., ORTS A., GONZALEZ J., HERNANDEZ F., RUIZ-BRAVO A. 1992b. Datos epidemiológicos de la colonización por *Streptococcus agalactiae* en mujeres no gestantes. *Clin Invest Gin Obst*; 19: 376-379.

DESA D. J., TREVENEN C. L. 1984. Intrauterine infections with group B β -haemolytic streptococci. *Br J Obst Gynaecol*; 91: 237-239.

DEVEIKIS A., SCHAUF V., MIZEN M., RIFF L. 1977. Antimicrobial therapy of experimental group B streptococcal infection in mince. *Antimicrob Agents Chemother*; 11: 817-820.

DIFCO LABORATORIES, MANUAL. 1953. 9^a Ed. Detroit, Michigan.

DILLON H. C., GRAY E., PASS M. A., GRAY B. M. 1982. Anorectal and vaginal carriage of group B streptococci during pregnancy. *J Infect Dis*; 145: 794-799.

DILLON H. C. Jr. 1985. GBS: The childhood and adolescent years. *Antibiot Chemother*; 35: 1-9.

DILLON H. C., KHARE S., GRAY B. M. 1987. Group B Streptococcal carriage and disease: A 6- year prospective study. *J Pediatr*; 110: 31-36.

DISPERSIO J. R., BARRETT J E., KAPLAN R. L. 1985. Evaluation of the spot-CAMP test for the rapid presumptive identification of group B streptococci. *Am J Clin Pathol*; 84: 216-219.

DORAND R. D., ADAMS G. 1976. Relapse during penicillin treatment of group B streptococcal meningitis. *J Pediatr*; 89: 188-190.

DUFF P. 1986. Pathophysiology and management of postcesarean endomyometritis. *Obstet Gynecol*; 67: 269-276.

DURHAM D. L., MATTINGLY S. J., DORAN T. I., MILLIGAN T. W., STRAUS D. C. 1981. Correlation between the production of extracellular substances by types III group B streptococcal strains and virulence in a mouse model. *Infect Immun*; 34: 448-454.

EASMON C. S. F., HASTINGS M. J. G., BLOWERS A., BLOXHAM B., DEELEY J., MARWOOD R., RIVERS R. P. A., STRINGER J. 1983a. Epidemiology of group B streptococci: one year's experience in an obstetric and special care baby unit. *Br J Obstet Gynecol*; 90: 241-246.

EASMON C. S. F. 1983b. Gastrointestinal carriage of group B streptococci. Letter. *J Infect Dis*; 148: 361-362.

EASMON C. S. F., HASTINGS M. J. G. 1985. GBS colonization in mothers and babies. *Antibiot Chemother*; 35: 28-39.

EASMON C. S. F. 1986a. Group B Streptococcus. *Infect Control*; 7: 135-137.

EASMON C. S. F. 1986b. The carrier state: group B Streptococcus. *J Antimicrob Chemother*; 18 (Suppl.A): 59-65.

EDWARDS E. A., LARSON G. L. 1974. New method of grouping beta-hemolytic streptococci directly on sheep blood agar plates by coagglutination of specifically sensitized protein a-containing staphylococci. *Appl Microbiol*; 28: 972-976.

EDWARDS M. S., KASPER D. L., BAKER C. J. 1979. Rapid diagnosis of type III group B streptococcal meningitis by latex particle agglutination. *J Pediatr*; 95: 202-205.

EDWARDS M. S., BAKER C. J. 1990. *Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococcus), p. 1554-1563. *In*: Mandell G. L., Douglas R. G., Bennett J. E. (eds), Principles and practice of infectious diseases, 3rd ed. Churchill Livingstone, New York.

ELLINGHAUSEN H. G., McCULLOUGH W. G. 1965. Nutrition of *Leptospira pomona* and growth of 13 other serotypes: a serum-free medium employing oleic albumin complex. *Am J Vet Res*; 26: 39-44.

FACKLAM R. R., PADULA J. F., THACKER L. G., WORTAOM E. C., SCONYERS B. J. 1974. Presumptive identification of group A, B, and D streptococci. *Appl Microbiol*; 27: 107-113.

FACKLAM R. R., WASHINGTON J. A. 1991. Streptococcus and related catalase-negative gram-positive cocci, p. 238-257. *In*: Balows A., Hausler W.J., Herrmann K. L., Isenberg H. D., Shadomy H. J. (eds), Manual of clinical microbiology, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- FALLON R. J. 1974. The rapid recognition of Lancefield group B haemolytic streptococci. *J Clin Pathol*; 27: 902-905.
- FARO S. 1981. Group B β -hemolytic streptococci and puerperal sepsis. *Am J Obstet Gynaecol*; 139: 686-689.
- FEDER H. M. Jr., PAE K. 1992. Group B streptococcal cellulitis-adenitis in a previously normal child. *Pediatr Infect Dis J*; 11: 768-770.
- FENTON L. J., HARPER M. H. 1979. Evaluation of colistin and nalidixic acid in Todd-Hewitt broth for selective isolation of group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 9: 167-169.
- FELDMAN W. E. 1976. Concentrations of bacteria in cerebrospinal fluid of patients with bacterial meningitis. *J Pediatr*; 88: 549-552.
- FERRIERI P., CLEARY P. P., SEEDS A. E. 1977. Epidemiology of streptococcal carriage in pregnant women and newborn infants. *J Med Microbiol*; 10: 103-114.
- FERRIERI P. 1985a. GBS enzymes, hemolysin, toxins and others products. *Antibiot Chemother*; 35: 57-70.
- FERRIERI P. 1985b. GBS infection in the newborn infant: Diagnosis and treatment. *Antibiot Chemother*; 35: 211-224.
- FINCH L. A., MARTIN D. R. 1984. Human and bovine group B streptococci: two distinct populations. *J Appl Bacteriol*; 57: 273-278.
- FINCH R. G. 1979. Serotyping of group-B streptococci by a slide co-agglutination method, p. 258-259. *In*: Parker M. T. (ed). *Pathogenic streptococci*. Reedbooks Ltd, Chertsey.
- FISCHER G., HORTON R. E., EDELMAN R. 1983. Summary of the National Institutes of Health Workshop on group B Streptococcal infection. *J Infect Dis*; 148: 163-166.
- FISCHER G. W., HEMMING V. G., HUNTER K. W., GLOFER H., BACHMAYER M., VON PIL A. R., HELTING T., WEIFMAN L. E., WILSON S. R., BARON P. A. 1986. Intravenous immunoglobulin in the treatment of neonatal sepsis: Therapeutic strategies and laboratory studies. *Pediatr Infect Dis*; 5 (3 Suppl): S171-S175.

FLANDROIS J. P., FLEURETTE J. 1975. Fréquence et conditions d'apparition de la pigmentation. Sensibilité aux antibiotiques. *Ann Biol Clin*; 33: 369-377.

FOSTER J. F. 1965. Physical properties of amylose and amylopectin in solution, p. 349-389. *In*: Whistler R. L., Paschall E. F. (eds), *Starch: Chemistry and technology*. Vol I. Aspects fundamental. Academic Press Inc. New York and London.

FOX P. F., MORRISSEY P. A., MULVIHILL D. M. 1982. Chemical and enzymatic modification of food proteins, p. 1-57. *In*: Hudson B. J. F. (ed). *Development in food proteins-I*. Applied Science Publishers Inc, Englewood, New Jersey 07631, USA.

FRANCIOSI R. A., KNOSTMAN J. D., ZIMMERMAN R. A. 1973. Group B streptococcal neonatal and infant infections. *J Pediatr*; 82: 707-718.

FRIEDMAN C. A., WENDER D. F., RAWSON J. E. 1984. Rapid diagnosis of group B streptococcal infection utilizing a commercially available latex agglutination assay. *Pediatrics*; 73: 27-30.

GARDNER S. E., YOW M. D., LEEDS L. J., THOMPSON P. K., MASON E. O., CLARK D. J. 1979. Failure of penicillin to eradicate group B streptococcal colonization in the pregnant woman. *Am J Obstet Gynecol*; 135: 1062-1065.

GARDNER S. E., MASON E. O., YOW M. D. 1980. Community acquisition of group B Streptococcus by infants of colonized mothers. *Pediatrics*; 66: 873-875.

GIBBS R., BLANCO J. D. 1981. Streptococcal infections in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 140: 405-411.

GRAY B. M., PASS M. A., DILLON H. C. 1979. Laboratory and field evaluation of selective media for isolation of group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 9: 466-470.

GRAZCA R. 1965. Minor constituents of starch, p. 105-128. *In*: Whistler R. L., Paschall E. F. (eds), *Starch: Chemistry and technology*. Vol I. Aspects fundamental. Academic Press Inc. New York and London.

GREENWOOD C. T. 1956. Aspects of the physical chemistry of starch. *Adv Carbohydr Chem*; 11: 335-393.

GRIFFITHS B. B. 1989. Iron and glucose affecting growth and haemolysin production in human strains of group B streptococci. *Microbios*; 58: 236-237.

GRIFFITHS B. B. 1990. Kinetics of hemolysin production in bovine group B streptococci. *J Basic Microbiol*; 30: 241-250.

GRUBB R., CHRISTENSEN K. K., CHRISTENSEN P., LINDEN V. 1982. Association between maternal Gm allotype and neonatal septicaemia with group B streptococci. *J Immunogenet*; 9: 143-147.

GUNN B. A. 1976. SxT and Taxo A disks for presumptive identification of group A and B streptococci in throat cultures. *J Clin Microbiol*; 4: 192-193.

GUNN B. A., OHASHI D. K., GAYDOS C. A., HOLT E. S. 1977. Selective and enhanced recovery of group A and B streptococci from throat cultures with sheep blood agar containing sulfamethoxazole and trimethoprim. *J Clin Microbiol*; 5: 650-654.

HAFT R. F., KASPER D. L. 1992. Infecciones materno-infantiles por estreptococo del grupo B. *Hosp Practice*; 7: 27-40.

HANSEN M. V., ELLIOTT L. P. 1980. New presumptive identification test for *Clostridium perfringens*. Reverse CAMP test. *J Clin Microbiol*; 12: 617-619.

HARDIE J. M. 1986. Genus *Streptococcus*, p. 1043-1071. In: Sneath P. H. A., Mair N. S., Sharpe M. E., Holt J. C. (eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 1 st. ed. Williams and Wilkins.

HARRIS E. L. V. 1989. Concentration of the extract, p. 125-174. In: Harris E. L. V., Angal S. (eds), *Protein purification methods a practical approach*. IRL Press at Oxford University Press.

HAUG R. H., SODERLUND E. 1977. Pigment production in Group B Streptococci. *Acta Pathol Microbiol Scand; Sect.B*, 85: 286-288.

HENRICHSEN J. 1985. The bacteriology of GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 53-56.

HOWARD J. B., McCRAKEN G. H. 1974. The spectrum of group B streptococcal infections in infancy. *Am J Dis Child*; 128: 815-818.

ISLAM A. K. M. 1977. Rapid recognition of group B streptococci. *Lancet*; i: 256-257.

- JELINKOVA J., MOTLOVA J. 1985a.** The nomenclature of GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 49-52.
- JELINKOVA J., MOTLOVA J. 1985b.** Worldwide distribution of two new serotypes of group B streptococci: Type IV and provisional type V. *J Clin Microbiol*; 21: 361-365.
- JENSEN N. E. 1985.** Epidemiological aspects of human/animal interrelationship in GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 40-48.
- JOHNSON D. R., FERRIERI P. 1984.** Group B streptococcal Ibc protein antigen: distribution of two determinants in wild-type strains of common serotypes *J Clin Microbiol*; 19: 506-510.
- JOHNS R. W., KHOURY L. A. 1980.** Pigment production in the presumptive identification of Group B Streptococci. *Mil Med*; 145: 57-58.
- JOKIPII A. M. M., JOKIPII L. 1976.** Presumptive identification and susceptibility of group B streptococci. *J Clin Pathol*; 29: 736-739.
- KANEKO J. J. 1989.** Serum Proteins and the dysproteinemias, p. 142-165. *In: Clinical Biochemistry of domestic animals*, 4th ed. Academic Press, Inc.
- KARAYIANNIS P., HOBSON D. 1981.** The role of calf serum in the growth of *Chlamydia trachomatis* in McCoy cell cultures. *J Gen Microbiol*; 122: 47-54.
- KASPER D. L., BAKER C. J., JENNINGS H. J. 1985.** Cell structure and antigenic composition of GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 90-100.
- KENNEDY H. E., SPECK M. L., AURAND L. W. 1955.** Studies on a growth stimulant from corn steep using *Lactobacillus casei*. *J Bacteriol*; 70: 70-77.
- KIM K. S., ANTHONY B. F. 1981.** Penicillin tolerance in group B streptococci isolated from infected neonates. *J Infect Dis*; 144: 411-419.
- KIM K.S. 1985.** Antimicrobial susceptibility of GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 83-89.
- KIRKEGAARD M. K., FIELD C. R. 1977.** Rapid slide coagglutination test for identifying and typing group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 6: 266-270.

KJEMS E., PERCH B., HENRICHSEN J. 1980. Serotypes of group B streptococci and their relation to hyaluronidase production and hydrolysis of salicin. *J Clin Microbiol*; 11: 111-113.

KORNBLATT A. N., ADAMS R. L., BARTHOLD S. W., CAMERON G. A. 1983. Canine neonatal deaths associated with group B streptococcal septicemia. *J Am Vet Med Assoc*; 183: 700-701.

LAMMLER C., SCHAUFUß P., BLOBEL H. 1985. Pigment production by streptococci of serological group B. *IRSC Med Sci*; 13: 396.

LANCEFIELD R. C. 1933. A serological differentiation of human and others groups of hemolytic streptococci. *J Exp Med*; 57: 571-595.

LANCEFIELD R. C., McCARTY M., EVERLY W. N. 1975. Multiple mouse-protective antibodies directed against group B streptococci. *J Exp Med*; 142: 165-179.

LASTER A. J., MICHELS M. L. 1984. Group B streptococcal arthritis in adults. *Am J Med*; 76: 910-915.

LERNER P. I., GOPALAKRIHNA K. V., WOLINSKY E., McHENRY M. C., TAN J. S., ROSENTHAL M. 1977. Group B Streptococcus (*S. agalactiae*) bacteriemia in adults: Analysis of 32 cases and review of the literature. *Medicine*; 56: 457-473.

LEVY N. J., BENES S., McCORMACK W. M. 1983. Growth of host cells and *Chlamydia trachomatis* in medium containing serum from 16-week-old calves. *J Clin Microbiol*; 17: 68-71.

LEWIN E. B., AMSTEL M. S. 1981. Natural history of group B Streptococcus colonization and its therapy during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 139: 512-515.

LIM D. V., MORALES W. J., WALSH A. F., KAZANIS D. 1986. Reduction of morbidity and mortality rates for neonatal group B streptococcal disease through early diagnosis and chemoprophylaxis. *J Clin Microbiol*; 23: 489-492.

LITTER M. 1984. Las Vitaminas, p. 400-417. *Compendio de Farmacología*. 3ªEd. Ed. El Ateneo. Barcelona.

MANNERS D. J. 1962. Enzymic synthesis and degradation of starch and glycogen. *Adv Carbohydr Chem*; 17: 371-431.

MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD C. L. 1991. Les milieux de culture. 9 ed. Doin Editeurs, Paris.

MARCHLEWICZ B. A., DUNCAN J. L. 1980. Properties of a hemolysin produced by group B streptococci. *Infect Immun*; 30: 805-813.

MASON E. O., WONG P., BARRETT F. F. 1976. Evaluation of four methods for detection of group B streptococcal colonization. *J Clin Microbiol*; 4: 429-431.

McCARTY M. (1980). Streptococci, p. 608-622. *In*: Davis B. D., Dulbecco R., Eisen H. N., Ginsberg H. S. (eds), *Microbiology*. 3rd ed. Harper & Row. New York.

McCRACKEN G. H., FELDMAN W. E. 1976. Editorial comment. *J Pediatr*; 89: 203-204.

McFADDIN J. F. 1980. Biochemical test for identification of medical bacteria, 2nd ed, p. 18-36. Williams & Wilkins. Baltimore.

McGEARY S. A., KIM K. S., WARD J. I. 1983. Susceptibility of group B Streptococcus to beta-lactam antibiotics. *Drugs Exp Clin Res*; IX: 693-696.

MEAD P.J., HARRIS R. E. 1978. The incidence of group B hemolytic Streptococcus in antepartum urinary tract infections. *Obstet Gynaecol*; 51: 412-414.

MERRITT K., JACOBS N. J. 1976a. Improved medium for detecting pigment production by group B Streptococci. *J Clin Microbiol*; 4: 379-380.

MERRITT K., TREADWELL T. L., JACOBS N. J. 1976b. Rapid recognition of group B Streptococci by pigment production and counterimmunoelectrophoresis. *J Clin Microbiol*; 3: 287-290.

MERRITT K., JACOBS N. J. 1978. Characterization and incidence of pigment production by human clinical group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 8: 105-107.

MEYNELL G. C., MEYNELL E. 1970. Theory and practice in experimental bacteriology, 2nd. ed., p. 35-66. Cambridge University Press, Cambridge.

MILLIGAN T. W., DORAN R. I., STRAUS D. C., MATTINGLY S. J. 1978a. Growth and amino acid requirements of various strains of group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 7: 28-33.

- MILLIGAN T. W., BAKER C. J., STRAUS D. C., MATTINGLY S. J. 1978b. Association of elevated levels of extracellular neuraminidase with clinical isolates of type III group B Streptococci. *Infect Immun*; 21: 738-746.
- MOLLER M., BORCH K., THOMSEN A. C., DINESEN K., ZDRAVKOVIC M. 1984. Rupture of fetal membranes and premature delivery associated with group B streptococci in urine of pregnant women. *Lancet* 1: 69-70.
- MOORE C. O., TUSCHHOFF J. V., HASTINGS C. W., SCHANEFELT R. V. 1984. Applications of starches in foods, p. 575-590. *In*: Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. (eds), *Starch: Chemistry and Technology*. 2nd ed. Academic Press, New York.
- MORAL L., MAJO J., RUBIO E. M., RUIZ C., CASALDALIGA J. 1992. Unsuspected rheumatic heart underlying group B streptococcal endocarditis at the age of 20 months. *Eur J Pediatr*; 152: 745-747.
- MORALES W. J., LIM D. V., WALSH A. F. 1986. Prevention of neonatal group B streptococcal sepsis by the use of a rapid screening test and selective intrapartum chemoprophylaxis. *Am J Obstet Gynecol*; 155: 979-983.
- MOTLOVA J., WAGNER M., JELINKOVA J. 1986. A search for new group B streptococcal serotypes. *J Med Microbiol*; 22: 101-105.
- MUETGEERT J. 1961. The fractionation of starch. *Adv Carbohydr Chem*; 16: 299-333.
- MYRBÄRCK K. 1948. Products of the enzymic degradation of starch and glycogen. *Adv Carbohydr Chem*; 3: 251-310.
- NEALON T. J., MATTINGLY S. J. 1983. Association of elevated levels of cellular lipoteichoic acids of group B streptococci with human neonatal disease. *Infect Immun*; 39: 1243-1251.
- NEKVASILOVA K., SIDLO J., HAZA J. 1970. Effect of peptidic groups isolated from enzymic casein hydrolysate on growth and toxinogenesis of *Clostridium welchii* (*perfringens*). *J Gen Microbiol*; 62: 3-16.
- NEMERGUT R. A., MERRITT K. 1982. Protective effects of the group B Streptococci carotenoid pigment. Abstracts of the Annual Meeting, American Society for Microbiology, Abstracts n°B-147, p.42.

NOBLE M. A., BENT J. M., WEST A. B. 1983. Detection and identification of group B streptococci by use of pigment production. *J Clin Pathol*; 36: 350-352.

NOYA F. J. D., RENCH M. A., METZGER T. G., COLMAN G., NAIDOO J., BAKER C. J. 1987. Unusual occurrence of an epidemic of type Ib/c group B streptococcal sepsis in a neonatal intensive care unit. *J Infect Dis*; 155: 1135-1144.

NOYA F. J. D., RENCH M. A., GARCIA-PRATS J. A., JONES T., BAKER C. J. 1988. Disposition of an immunoglobulin intravenous preparation in very low birth weight infants. *J Pediatr*; 112: 278-283.

OXOID MANUAL. 1988. Medios de cultivo: Ingredientes para su preparación y otros elementos de laboratorio. Oxoid Limited, Wade Roas, Basingstoke, Hampshire, England. 5ª Ed. y Apéndice 1982/1988.

PAREDES A., WONG P., YOW M. D. 1976. Failure of penicillin to eradicate the carrier state of group B *Streptococcus* in infants. *J Pediatr*; 89:191-193.

PAREDES A., WONG P., MASON E. O. Jr., TABER L. H., BARRETT F. F. 1977. Nosocomial transmission of group B streptococci in a newborn nursery. *Pediatrics*; 59: 679-682.

PAREJA L. 1993. Efecto de sustancias relacionadas con la vía del folato sobre la producción de pigmento de *Streptococcus agalactiae*. Tesina de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

PASS M. A., GRAY B. M., KHARE S., DILLON H. C. 1979. Prospective studies of group B streptococcal infections in infants. *J Pediatr*; 95: 437-443.

PASS M. A., KHARE S., DILLON H. C. 1980. Twin pregnancies: incidence of group B streptococcal colonization and disease. *J Pediatr*; 97: 635-637.

PASS M. A., GRAY B. M., DILLON H. C. Jr. 1982. Puerperal and perinatal infections with group B streptococci. *Am J Obstet Gynecol*; 143: 147-152.

PATTERSON M. J., HAFEEZ A. 1976. Group B streptococci in human disease. *Bacteriol Rev*; 40: 774-792.

PAZUR J. H. 1965. Enzymes in synthesis and hydrolysis of starch, p. 133-171. *In: Whistler R. L., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and technology. Vol I. Aspects fundamental.* Academic Press Inc. New York and London.

PERCH B., KJEMS E., HENRICHSEN J. 1979. New serotypes of group B streptococci isolated from human sources. *J Clin Microbiol*; 10: 109-110.

PERSSON K. M. S., FORSGREN A. 1986. Antimicrobial susceptibility of group B streptococci. *Eur J Clin Microbiol*; 5: 165-167.

PERSSON K. M. S., FORSGREN A. 1987. Evaluation of culture methods for isolation of group B streptococci. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 6: 175-177.

POMPEI R., LAMPIS G., BERLUTTI F., THALLER M. 1991. Characterization of yellow-pigmented Enterococci from severe human infections. *J Clin Microbiol*; 29: 2884-2886.

POLSKY B., GOLD J. W. M., WHIMBEY E., DRYJANSKI J., BROWN A. E., SCHIFFAN G., ARMSTRONG D. 1986. Bacterial pneumonia in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med*; 104: 38-41.

PYATI S. P., PILDES R. S., JACOBS N. M., RAMAMURTHY R. S., YEH T. F., RAVAL D. S., LILIEN L. D., AMMA P., METXGER W. I. 1983. Penicillin in infants weighing two kilograms or less with early-onset group B streptococcal disease. *N Engl J Med*; 308: 1383-1389.

RATNER H. B., WEEKS L. S., STRATTON C. W. 1986. Evaluation of spot CAMP test for identification of group B streptococci. *J Clin Microbiol*; 24: 296-297.

REARDON E. P., NOBLE M. A., LUTHER E. R., WORT A. J., BENT J., SWIFT M. 1984. Evaluation of a rapid method for the detection of vaginal group B streptococci in women in labor. *Am J Obstet Gynecol*; 148: 575-578.

RICHARDSON H. L. 1987. Neonatal Group B streptococcal infection - detection of risk mothers. *Culture*; 8: 2.

ROBINSON J. A., MEYER F. P. 1966. Streptococcal fish pathogen. *J Bacteriol*; 95: 512.

ROBYT J. F. 1984. Enzymes in the hydrolysis and synthesis of starch, p. 87-124. *In: Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and Technology. 2nd ed. Academic Press, New York.*

ROE M. H., TODD J. K., FAVARA B. E. 1976. Non haemolytic group B streptococcal infection. *J Pediatr*; 89: 75

- ROMERO R., WILKINSON H. W. 1974.** Identification of group B streptococci by immunofluorescence staining. *Appl Microbiol*; 28: 199-204.
- ROLSTON K. V. I. 1986.** Susceptibility of group B and group G streptococci to newer antimicrobial agents. *Eur J Clin Microbiol*; 5: 534-536.
- ROSENBERG M., DOYLE R. J. 1990.** Microbial cell surface hydrophobicity: History, measurement and significance, p. 1-38. *In*: Doyle R. J., Rosenberg M. (eds), *Microbial cell surface hydrophobicity*. American Society for Microbiology, Washington.
- ROSS P. W. 1984.** Group B Streptococcus. Profile of an organism. *J Med Microbiol*; 18: 139-166.
- SANTOS J. I., HILL H. R. 1984.** Infecciones bacterianas del recién nacido, p.131-147. *En*: Wedgwood R. J., Davis S. D., Ray C. G., Kelley V. C. (eds), *Patología infecciosa pediátrica*. Vol I. Ed. Doyma S. A. Barcelona.
- SCHAUF V., DEVEIKIS A., RIFF L., SEROLA A. 1976.** Antibiotic- killing kinetics of group B streptococci. *J Pediatr*; 89: 194-198.
- SCHAUFUß P., LAMMLER CH., BLOBEL H. 1985.** Effects of glucose and trimethoprim on pigment production of group B streptococci. *IRSC Med Sci*; 13: 842.
- SCHOCH T. J. 1945.** The fractionation of starch. *Adv Carbohydr Chem*; 1: 247-277.
- SHANNON J. C., GARWOOD D. L. 1984.** Genetics and physiology of starch development, p. 26-79. *In*: Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. (eds), *Starch: Chemistry and Technology*. 2nd ed. Academic Press, New York.
- SIGMA MANUAL. 1993.** Reactivos bioquímicos y orgánicos para la Investigación y el Diagnóstico. Sigma Chemical Co., Sigma-Aldrich Química S.A. Madrid.
- SIEGEL J. D., SHANNON K. M., DE PASSE B. M. 1981.** Recurrent infection associated with penicillin-tolerant group B streptococci: a report of two cases. *J Pediatr*; 99: 920-924.
- SMITH S. M., ENG R. H. K., LANDESMAN S. 1982.** Effect of rifampin on ampicillin killing of group B streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 22: 522-524.

- SONNENWIRTH A. C. 1983.** Cocos gram positivos y gram negativos, p. 1500-1534. *En:* Sonnenwirth A. C., Jarett L., Gradwohl Métodos y diagnósticos del laboratorio clínico. 8ªed. Ed. Medica Panamericana S. A. Buenos Aires.
- STEERE A. C., ABER R. C., WARFORD LL. R., MURPHY K. E., FEELEY J. C., HAYES P. S., WILKINSON H. W., FACKLAM R. R. 1975.** Possible nosocomial transmission of group B streptococci in a newborn nursery. *J Pediatr*; 87: 784-787.
- STEINBRECHER P. 1981.** Serious infection in an adult due to penicillin-tolerant group B Streptococcus. *Arch Intern Med*; 141: 1714-1715.
- SUKROONGREUNG S., NILAKUL C., TUNTIMAVANICH S., SANTIWATANAKUL S. 1984.** New medium for enhancing pigment production of group B streptococci. *J Clin Pathol*; 37: 1310-1311.
- SWINGLE H. M., BUCCIARELLI R. L., AYOUB E. M. 1985.** Synergy between penicillins and low concentrations of gentamicin in the killing of group B streptococci. *J Infect Dis*; 152: 515-520.
- TAPSALL J. W. 1986.** Pigment production by Lancefield-Group B streptococci (*Streptococcus agalactiae*). *J Med Microbiol*; 21: 75-81.
- TAPSALL J. W. 1987a.** Relationship between pigment production and haemolysin formation by Lancefield group B streptococci. *J Med Microbiol*; 24: 83-87.
- TAPSALL J. W., PHILLIPS E. A. 1987b.** Presumptive identification of Group B Streptococci by rapid detection of CAMP factor and pigment production. *Diagn Microbiol Infect Dis*; 7: 225-228.
- TAYLOR R. F., DAVIES B. H. 1974.** Triterpenoid carotenoids and related lipids. The triterpenoid carotenes of *Streptococcus faecium*. *Biochem J*; 139: 751-760.
- TOPLEY AND WILSON'S. 1975.** The Streptococci, p.712-763. *In:* Wilson G. S., Miles A. (eds), Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. 6th. ed. Vol I. Ed. Edward Arnold. London.
- TSAIHONG J. C., WENNERSTROM D. E. 1983.** Effect of carrier molecules on production and properties of extracellular hemolysin produced by *S. agalactiae*. *Curr Microbiol*; 9: 333-338.

- TUOMANEN E. 1986.** Phenotypic tolerance: The research for β -lactams antibiotics that kill non growing bacteria. *Rev Infect Dis*; 8: S-3 279-291.
- VERGHESE A., MIREAULT K., ARBEIT R. D. 1986.** Group B streptococcal bacteriemia in men. *Rev Infect Dis*; 8: 912-917.
- WAGNER B., WAGNER M., KUBIN V., RYC M. 1980.** Immunoelectron microscopic study of the location of group-specific and protein type-specific antigens of group B streptococci. *J Gen Microbiol*; 118: 95-105.
- WAGNER M., WAGNER B. 1985.** Immunoelectron microscopical demonstration of the cell wall and capsular antigens of GBS. *Antibiot Chemother*; 35: 119-127.
- WAITKINS S. A. 1980.** Evaluation of the rapid methods of identifying group B streptococci. *J Clin Pathol*; 33: 302-305.
- WAITKINS S. A. 1982.** A selective and differential medium for group B streptococci. *Med Lab Sci*; 39: 185-188.
- WALLIN J., FORSGREN A. 1975.** Group B streptococci in venereal disease clinic patients. *Br J Vener Dis*; 51: 401-404.
- WALTER S. H., SANTOS A. Q., QUINTERO B. A. 1976.** Recurrence of group B III streptococcal meningitis. *J Pediatr*; 89: 187-188.
- WANG E. E. .L., HAMMERBERG O., LYN P., PENG H, HUNTER D., RICHARDSON H. 1988.** Rapid detection of group B streptococcal carriage in parturient women using a modified starch serum medium. *Clin Invest Med*; 11: 52-56.
- WANG E., RICHARDSON H. 1990.** A rapid method for detection of group B Streptococcal colonization: Testing at the bedside. *Obstet Gynecol*; 76: 882-885.
- WAYNE M. C., SPECK M. L. 1966.** Identification of nutritional components in Trypticase responsible for recovery of *Escherichia coli* injured by freezing. *J Bacteriol*; 91: 1098-1104.
- WEEKS J. L., MASON E. O., BAKER C. J. 1981.** Antagonism of ampicillin and chloramphenicol for meningeal isolates of group B Streptococci. *Antimicrob Agents Chemother*; 20: 281-285.

WENNERSTROM D. E., TSAIHONG J. C., CRAWFORD J. T. 1985. Evaluation of the role of hemolysin and pigment in pathogenesis of early-onset group B streptococcal infection, p.155-156. *In: Kimura Y., Kotami S., Shiokawa Y. (eds), Recent Advances in Streptococci and Streptococcal Diseases.* Reedbooks, Bracknell, Berkshire, England.

WENNERSTROM D. E., LEE L. N., BASEMAN A. G., LeBLANC D. J., CERNEGLIA C. E., TROTTER K. M. 1990. Genetics and characterization of group B streptococcal pigment. p. 224-227. *In: Dunny G. M., Cleary P. P., McKay L. L. (eds), Genetics and molecular biology of streptococci, lactococci and enterococci.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.

WESSELS M. R., BENEDI W. J., JENNINGS H. J., MICHON F., DIFABIO J. L., KASPER L. 1989. Isolation and characterization of type IV group B *Streptococcus capsular polysaccharide.* *Infect Immun*; 57: 1089-1094.

WESSELS M. R., DIFABIO J. L., BENEDI V. J., KASPER D. L., MICHON F. M., BRISSON J. R., JELINKOVA J., JENNINGS H. J. 1991. Structural determination and immunochemical characterization of the type V group B *Streptococcus capsular polysaccharide.* *J Biol Chem*; 266: 6714-6719.

WHISTLER R. L., CORBET W. M. 1957. Polysaccharides. Part I. *In: Pigman W. (ed), The carbohydrates. General aspects and phyto and microbial polysaccharides.* Academic Press, New York.

WHISTLER R. L. 1965. Fractionation of starch, p. 331-346. *In: Whistler R. L., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and technology. Vol I. Aspects fundamental.* Academic Press Inc. New York and London.

WHISTLER R. L., DANIEL J. R. 1984. Molecular structure of starch. p. 153-178. *In: Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and Technology. 2nd ed.* Academic Press, New York.

WIBAWAN I. W. T., LÄMMLER C., SMOLA J. 1993. Properties and type antigen patterns of group B streptococcal isolates from pigs and nutrias. *J Clin Microbiol*; 31: 762-764.

WILKINSON H. V., EAGON R. G. 1971. Type specific antigens of group B type Ic streptococci. *Infect Immun*; 4: 596-604.

WILKINSON H. W., FACKLAM R. R., WORTHAM E. C. 1973. Distribution by serological type of group B streptococci isolated from a variety of clinical material over a five-year period. *Infect Immun*; 8: 228-235.

WILKINSON H. W. 1978. Analysis of group B streptococcal types associated with disease in human infants and adults. *J Clin Microbiol*; 7: 176-179.

WILLETT N. P., MORSE G. E., CARLISLE S. A. 1967. Requirements for growth of *Streptococcus agalactiae* in a chemically defined medium. *J Bacteriol*; 94: 1247-1248.

WOLFRON M. L., EL-KADEM H. 1965. Chemical evidence for the structure of starch, p. 251-274. *In: Whistler R. L., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and technology. Vol I. Aspects fundamental. Academic Press Inc. New York and London.*

WOOD E. G., DILLON H. C. 1981. A prospective study of group B streptococcal bacteriuria in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*; 140: 515-520.

WÜST J., HEBISCH G., PETERS K. 1993. Evaluation of two enzyme immunoassays for rapid detection of group B streptococci in pregnant women. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*; 12: 124-127.

YOUNG A. H. 1984. Fractionation of starch, p. 249-274. *In: Whistler R. L., Bemiller J. N., Paschall E. F. (eds), Starch: Chemistry and Technology. 2nd ed. Academic Press, New York.*

YOW M. D., MASON E. O., LEEDS L. J., THOMPSON P. K., CLARK D. J., GARDNER S. E. 1979. Ampicillin prevents intrapartum transmission of group B *Streptococcus*. *J Am Med Assoc*; 241: 1245-1247.

YOW M. D., LEEDS L. J., THOMPSON P. K., MASON E. O., CLARK D. J., BEACHLER C. W. 1980. The natural history of group B streptococcal colonization in the pregnant woman and her offspring. I. Colonization studies. *Am J Obstet Gynecol*; 137: 34-38.