

Tesis de Posgrado

Ensayo de un medio con cianuro de sodio para investigar estreptococos en aguas : Estudio bioquímico de los cultivos aislados con miras a establecer el origen humano o animal de la contaminación

Deyheralde de Rossi, Alina María F.

1959

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Deyheralde de Rossi, Alina María F.. (1959). Ensayo de un medio con cianuro de sodio para investigar estreptococos en aguas : Estudio bioquímico de los cultivos aislados con miras a establecer el origen humano o animal de la contaminación. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1015_DeyheraldedeRossi.pdf

Cita tipo Chicago:

Deyheralde de Rossi, Alina María F.. "Ensayo de un medio con cianuro de sodio para investigar estreptococos en aguas : Estudio bioquímico de los cultivos aislados con miras a establecer el origen humano o animal de la contaminación". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1959.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1015_DeyheraldedeRossi.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FOYMA

7 19 3

ENSAYO DE UN MEDIO CON CIANURO DE SODIO PARA INVESTIGAR
ESTREPTOCOCOS EN AGUAS

ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS CULTIVOS AISLADOS CON MIRAS
A ESTABLECER EL ORIGEN HUMANO O ANIMAL
DE LA CONTAMINACION

Noviembre, 1959m

Alina María F. Deyheralde de Rossi

Per. de Tesis: 1015

ENSAYO DE UNMEDIO CON CIANURO DE SODIO PARA INVESTIGAR ESTREPTOCOCOS EN AGUAS.-

ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS CULTIVOS AISLADOS CON MIRAS A ESTABLECER EL ORIGEN HUMANO O ANIMAL DE LA CONTAMINACIÓN.-

R E S U M E N

Balcazar de Aztegui y colaboradoras publicaron en 1954 un método para el aislamiento selectivo de estreptococos de la nasofaringe, materias fecales y leche.

Es el este trabajo, el que ha inducido a ensayar medios a base de cianuro de sodio para la investigación de estreptococos en aguas de diferente origen.

Se ha ensayado la adición de cianuro de sodio a diversos medios apropiados para el desarrollo de estreptococos, determinando la sensibilidad de los mismos frente a diluciones de cultivos puros de estreptococos.

Los medios probados fueron, el caldo glucosado y el caldo de Todd y el medio de Rothe y otro denominado "A", que es una modificación del medio "S.F." de Hajna y Perry, en los cuales se reemplazó la azida sódica por el cianuro de sodio.

No se observó diferencias marcadas en la sensibilidad de dichos medios por lo que se adoptó por su simplicidad, el caldo

glucosado adicionado con 25 mg% de cianuro de sodio para emplearlo en la investigación de estreptococos en aguas.

Se estudió la eficacia del medio glucosado cianurado comparativamente con la del medio "A" examinando 20 muestras de agua del Río de la Plata, 56 de pozos semisurgentes y 65 de natatorios.

El medio glucosado cianurado resultó ser algo más sensible aunque menos selectivo que el medio "A" con azida, frente a aguas de río y pozos y menos sensible y selectivo frente a aguas de natatorios. No se aconseja por lo tanto emplearlo en sustitución de los medios a base de azida bien conocidos.

Se determinó paralelamente la presencia de bacterias coliformes en todas las muestras examinadas hallándose con relación al número de muestras estreptococos positivas igual cantidad de muestras de ~~prós~~ coliformes positivas, un número algo mayor de muestras de pozos coliformes positivas y considerablemente menos aguas de natatorios coliformes positivas. Además en aguas de pozos y natatorios el % de muestras con Esch.coli resultó muy inferior al de muestras con estreptococos.

La segunda parte del trabajo, consistió en la clasificación de los estreptococos aislados en muestras de aguas de diversa procedencia tendiente a establecer el origen de la contaminación, siendo ésta una cuestión de verdadero interés sanitario.

Siguiendo ~~las técnicas~~ propuestas por Cooper y Ramadan, se estudiaron 128 cultivos puros de estreptococos aislados de las

diversas muestras examinadas, con el objeto de establecer el origen humano o animal de los mismos. Los cultivos de estreptococos aislados, fueron clasificados : a) por identificación de cepas y b) por origen de la contaminación.

Los resultados alcanzados por los ensayos bioquímicos en la clasificación de estreptococos por identificación de cepas (a), no concordaron totalmente con los hallados por Cooper y Ramadan; algunas cepas se apartaron en una o más reacciones de su comportamiento normal.

Distribuidas las cepas identificadas por (a) de acuerdo a su origen se observó un predominio en aguas de río, de estreptococos de origen animal, en aguas de pozos, de origen humano y en aguas de natatorios igual porcentaje de cepas de origen humano y animal.

En los resultados alcanzados en la clasificación de estreptococos por origen de contaminación (b) se obtuvo también un predominio, en aguas de río de estreptococos de origen animal; en aguas de pozos y natatorios predominaron las contaminaciones de origen humano.

Comparadas ambas clasificaciones (a) y (b) se observó un resultado aproximado en el origen de las cepas, en aguas de río y pozos. En aguas de natatorios hubo una mayor discrepancia.

Dada la simplicidad del método para establecer el origen de la contaminación (b) y el paralelismo obtenido en relación a

✓
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**ENSAYO DE UN MEDIO CON CLAYERO DE SODIO PARA INVESTIGAR
ESTREPTOCOCCOS EN AGUAS
ESTUDIO BIOQUIMICO DE LOS CULTIVOS AISLADOS CON MIRAS
A ESTABLECER EL ORIGEN HUMANO O ANIMAL
DE LA CONTAMINACION**

— • —

TESIS

Tesis para optar al Título de Doctora en Química

TESIS: 1015

Noviembre 1999

Alisa María F. Devesralde de Rossi

T. 1015

COPY

PADRINO DE TESIS

Profesor Dr. Raúl Ferracols

— —

S U M A R I O

- I - Antecedentes
- II - Ensayo de la sensibilidad de medios, con cianuro de sodio
- III - Estudio comparativo entre el medio glucosado cianurado y el medio "A" en el aislamiento de estreptococos
- IV - Clasificación de las cepas de estreptococos aisladas
 - a) - Por identificación de cepas
 - b) - Por origen de contaminación
- V - Resumen y conclusiones
- VI - Apéndice
- VII - Bibliografía

Agradezco la amplia colaboración que en todo momento me han dispensado, el Dr. Ramón H. Leiguarda y el Dr. Osvaldo Peso.

Agradecimiento que hago extensivo a las autoridades del Laboratorio de las Obras Sanitarias de la Nación, que me han permitido la realización de la parte experimental correspondiente

----- . -----

I. ANTECEDENTES

La detorminación de bacterias coliformes para establecer la pureza bacteriológica de un agua, continúa siendo el método más seguro y sencillo de que se dispone para determinar contaminaciones de origen fecal.

Presenta sin embargo algunos motivos de crítica que impiden considerarlo como un método ideal. Entre ellos; el discutido significado sanitario de algunos organismos del grupo coliforme como el Aerobacter aerógenes y los bacilos intermediarios cuyo habitat "normal" no es la materia fecal.

Un resultado negativo en la investigación de bacterias coliformes, tal como actualmente se realiza, no constituye de acuerdo con la experiencia recogida en los últimos años la prueba absoluta de ausencia en el agua, de bacterias nocivas para la salud. Se ha observado con frecuencia trastornos intestinales originados por la ingestión de aguas sin bacterias coliformes en las cuales se pone de manifiesto la existencia de fermentadores lentos de lactosa, bacterias anaerobias esporuladas, organismos del género Pseudomonas etc.

Es así que, desde hace años y en repetidas oportunidades, diversos autores han considerado a los estreptococos como posibles sustitutos de las bacterias coliformes como índice de contaminación del agua o simplemente como complemento del análisis bacteriológico a fin de facilitar su interpretación. Ello se debe a que los estreptococos se encuentran siempre en el intestino normal humano y animal no hallándose en cambio en lugares fuera del contacto con la vida animal

El criterio de pureza bacteriológica del agua, basado en la investigación de bacterias intestinales, según los investigadores Mallmann, Calvert, France y Fuller, debería modificarse cuando se trata de la calidad de aguas de natatorios. En efecto, el uso cada vez mayor de los natatorios, ha aumentado la posibilidad de contraer infecciones originadas por bacterias patógenas provenientes de los bañistas sean estos enfermos o portadores. Las infecciones producidas pueden ser de diferente índole, siendo las más comunes: otitis, amigdalitis, conjuntivitis, forunculosis, micosis, antrax, fiebres intestinales etc. y dentro de los agentes causantes de los mismos, los cocos Gram positivos ocupan un lugar destacado. Ello impone por lo tanto una revisión de las normas actuales de pureza.

Mallmann (1) en 1928 y luego Mallmann y Gelpi (2) en 1930 ensayaron los primeros métodos para la determinación de estreptococos en piletas de natación, usando caldo lactosado standard.

Otro medio usado, no selectivo, fué el medio de Todd Hewitt (3) empleado en el estudio de las propiedades morfológicas y bioquímicas de los estreptococos.

Los métodos de enriquecimiento de estreptococos a base de telurito de potasio aparecieron después de los trabajos de Fleming (4) del año 1932, en el que se demostró que algunas bacterias no inhibidas por la penicilina lo son por el telurito y fueron Perry y Petran (5) en 1932 quienes lo incorporaron a un medio de enriquecimiento. El poder inhibitor de la droga sobre bacterias coliformes fué constatado por Fleming y Young (6) en 1940 y Chapman (7) en 1944 lo

probó para el aislamiento de estreptococos hemolíticos y no hemolíticos.

En 1937 Hartman (8) empleó un medio con azida sódica para suprimir el desarrollo de bacterias Gram negativas permitiendo el crecimiento de estreptococos. Snyder y Lichstein (9-10) lo aplicaron para el aislamiento de cocos Gram positivos en presencia de bacterias del género Proteus. Con una concentración de 0,01 % evitaban el extendido característico de dicho microorganismo frenando al mismo tiempo el crecimiento del Esch.coli y S.typhi. Con una concentración mayor (0,05 %) no obtenían un crecimiento abundante de estreptococos y algunos grupos podían no desarrollarse. Inversamente una concentración menor (0,008%) traía aparejado un extendido de bacterias del género Proteus y reproducción moderada de Esch.coli.

Mallmann (10) en 1940 propuso un medio líquido con azida sódica para la determinación de estreptococos.

Conocida la propiedad de la azida sódica, son varios los autores que la incorporan a medios líquidos y sólidos. Parker (12) en 1943 ideó un medio para el desarrollo de los estreptococos y del Erysipelotrix rhusiopathiae, aconsejando una concentración de la droga de 0,05 % sola o con 0,0002 % de violeta cristal.

Hajna y Perry (13) hicieron un estudio comparativo entre las bacterias del grupo Coli y el estreptococo fecal, incubando a temperatura de 45,5°C. a la cual desarrolla el Streptococcus faecalis y no los otros. En efecto el desarrollo y la formación de ácido

en el llamado medio "S.F.", es confirmatorio de la presencia del estreptococo fecal. Puede usarse inoculándolo directamente con agua, leche o líquido cloacal o bien sembrándolo con un cultivo, desarrollado en un medio presuntivo, como por ejemplo, caldo lactosado.

White y Sherman (14) en 1944 ensayaron un medio para el aislamiento de enterococos de la leche a base de 0,03 % de azida y de 325 U Ox. de penicilina por litro. Neuman (15) en el mismo año propuso usar la azida en concentraciones de 0,04 - 0,06 % para aislar enterococos en los quesos. Pike (16-17) en 1945, estudió la bondad de dos métodos a base de 0,006 % de azida, con el agregado de 0,0002 % de violeta cristal uno de ellos y sin este colorante el otro.

Winter y Sandhozer (18) en 1946, modificaron el medio de White y Sherman mediante el agregado de azul de metileno en concentración de 0,001 %, el aumento de las unidades de penicilina a 6500 Ox. por litro, el empleo de ClNa en la elevada concentración de 6,5% y el ajuste del pH a un valor cercano a 9,6. Este medio fué aplicado exitosamente en la investigación de enterococos en agua, líquido cloacal, heces etc.

En 1947 Leiguarda, Peso y Kempny (19) ensayaron comparativamente técnicas para investigar estreptococos en aguas, trabajando con un medio conteniendo telurito de potasio y con otro a base de azida sódica preconizado por Hajna y Perry y aplicado por Ostrolenk y Hunter (20) en 1946 al estudio de enterococos en heces.

En 1948 Rothe (21) propuso una fórmula nueva para un medio

con azida, el cual es una modificación de los medios de Mallmann y Hajna y Perry; en 1950 Mallmann y Seligmann (22) lo ensayaron comparativamente para el desarrollo de estreptococos en agua de río y de natatorios, con caldo lactosado, medio azida (Mallmann) y caldo "S.F." obteniéndose los resultados más eficientes con medio de Rothe

En 1953 Litsky, Mallmann y colaboradores (23) obtuvieron resultados satisfactorios ensayando una modificación del medio "S.F" de Hajna y Perry.

El efecto tóxico del cianuro de sodio en las células vegetales y animales se conoce desde hace tiempo.

Claudio Bernard (24) estudió la acción de los cianuros sobre la respiración celular.

En 1927 Burnet (25) señaló que los estreptococos podían ser cultivados en medios sólidos conteniendo 0,05 % de cianuro de potasio que actúa como inhibidor del desarrollo de otras bacterias.

Braun-Guggenheim (26) en 1932 y Braun (27) en 1938-39 notaron que cultivos del grupo Klebsiella-Aerobacter se desarrollaban en medio con concentración de cianuro que inhibían el desarrollo del Esch.coli.

Buttix (28) en 1953 empleando el medio de Braun, estudió cultivos de salmonelas y en 1954 Moller (29) ideó un medio con cianuro para determinar bacterias del mismo género, obteniendo resultados favorables.

Balcazar de Aztegui y colaboradoras (3) en 1954, publicaron un método para el aislamiento selectivo de estreptocococ de na-

sofaringe, materias fecales y leche.

De acuerdo a este trabajo, el empleo del cianuro de sodio en una concentración de 25 mg %, añadido a un medio adecuado (caldo glucosado, caldo infusión de corazón), permite el aislamiento en 24 horas, de estreptococos de diversas fuentes, siendo recomendable su empleo para el aislamiento rutinario de estreptococos de la rinofaringe, especialmente, cuando se lleva a cabo un estudio epidemiológico.

Este trabajo es el que ha inducido a ensayar medios a base de cianuro de sodio para la investigación de estreptococos en agua. Además, dado que durante el transcurso de este ensayo se examinarían distintos tipos de aguas con el consiguiente aislamiento de estreptococos, se pensó en completar el estudio efectuando la clasificación de los cultivos aislados mediante las pruebas propuestas por Cooper y Ramadan (31) con miras a establecer si los mismos eran de origen humano o animal; una cuestión de verdadero interés sanitario ya que contribuye a aclarar el significado higiénico de la contaminación.

Este problema existe desde que Andrewes (32) en 1906 da al Enterococcus descripto morfológicamente por Thiemelin en 1899 el nombre específico de Streptococcus faecalis.

Dible (33) en 1921 contribuyó al estudio de las cepas de origen fecal considerando, entre otras reacciones, como fundamentales, la resistencia al calor a 60°C. durante 15 minutos y la fermentación.

tación del manitol.

En 1933 Lancefield (34) agrupó serológicamente los diferentes estreptococos, observando que su grupo "D" de estreptococos hemolíticos presentaba características semejantes a los llamados enterococos.

Algunos investigadores, entre ellos, Sherman (35) 1937 usó el término de enterococo para designar un grupo de estreptococos el cual incluía cepas hemolíticas, no hemolíticas y licuadoras de gelatina, (Str. zymogenes, durans y liquefaciens)

En 1943 Shattock y A. Mattick (36) consideraron el Str. liquefaciens como una variedad del Str. faecalis; también quedó perfectamente diferenciado el Str. lactis del Str. faecalis.

Dentro de las heces humanas, bovinas y ovinas, es común encontrar diferentes grupos de estreptococos que difieren del Streptococcus faecalis típico en uno o más criterios esenciales y usualmente en otros secundarios.

Puesto que el objeto del trabajo de Cooper y Ramadan (31) consistió en clasificar los estreptococos según su origen, se consideró conveniente agruparlos, ampliando su clasificación, bajo el nombre de Str. faecalis atípicos variedad I, II, III, IV y V, aplicándose este nombre a las cepas que difieren en dos o tres características standards del Str. faecalis típico. Esta clasificación incluye a los estreptococos agrupados como "variantes" del Str. faecalis, así denominados, por algunos investigadores.

El aislamiento de estreptococos a partir de materia fecal

y la clasificación de los mismos, demostró que la variedad de las cepas aisladas depende en parte del método de aislamiento utilizado. Por ejemplo: el uso de dos métodos de aislamiento de estreptococos, altamente recomendados, tales como el método del calentamiento o el del telurito, usados comparativamente, acusaron la presencia de diferentes cepas de estreptococos.

Investigadores tales como: Cooper, Baker, Elliot y Wood (37) en 1942 estudiaron otros métodos de aislamiento, recomendando el uso de un medio con tetracionato. Cooper y Linton (38) en 1947, demostraron la resistencia de los estreptococos al acetato de talio. Además, como ya vimos, se estudiaron medios con azida sódica.

Cooper K.E. y Ramadan (31) en 1955 aislaron estreptococos a partir de excrementos humanos, vacunos y ovinos, comparando diferentes métodos de aislamiento, a) tetracionato, b) telurito y c) sales de talio. d) calentamiento.

El método del telurito demostró poseer alta eficiencia, aislándose el 97 % de las cepas de origen humano, vacuno y ovino. Fue realizado un estudio de las propiedades de las cepas aisladas, basado en pruebas de resistencia al calor y pruebas bioquímicas, clasificándose luego las cepas.

De acuerdo con este método, 40 % de los estreptococos de origen humano fueron agrupados como Streptococcus faecalis; no se halló Streptococcus faecalis entre muestras de vacunos u ovinos. El Str. durans fue aislado también exclusivamente de heces humanas y representó el 4 % de las cepas. El Str. faecalis variedad liquefaciens y el Str. faecalis variedad zymogenes halláronse en un 29 % en heces de origen humano.

La variedad liquefaciens representa el 14 % de origen bovino y el 18 % de cepas ovinas. La variedad zymogenes no se encontró entre los estreptococos bovinos, pero forma un 6 % de estreptococos de origen ovino.

Con respecto a las cepas clasificadas como variedades del Str. faecalis se observó que el Str. faecalis atípico I se identificó en heces de origen humano y bovino; la variedad atípica II en excrementos humanos y ovinos y las variedades III, IV, y V demuestran origen exclusivamente animal.

El trabajo realizado por Cooper y Ramadan, fué completado luego de seleccionado el medio del telurito de potasio, como el más conveniente, aislando cepas de estreptococos a partir de 350 muestras de materia fecal de diferente origen : 130 humanas, 110 vacunas y 110 ovinas. Luego, las cepas aisladas fueron cultivadas en caldo bacto peptona (16 horas a 37°C.) para su examinación

La diferenciación entre las cepas de origen humano y animal es de naturaleza cuantitativa y queda demostrada realizando los siguientes tests: Resistencia al calor: por calentamiento a 60°C. durante media hora y sub-cultivo en agar sangre al 10 %. Resistencia al calor y al telurito: las mismas muestras usadas en el ensayo anterior, fueron sub-cultivadas en medio telurito de Mc.Leod's (39) Reducción del medio leche verde de B. de Janus . Luego de realizado el ensayo de standardización del colorante con varias partidas de diferente origen, se utilizó una denominada Gurr N° 1041.

Los resultados obtenidos permitieron reunir las cepas en

6 grupos. Dentro de los grupos I y II, quedan incluidas las cepas de origen humano, 98,5 % de las cepas de origen animal se situaron dentro del grupo III (50,4 % vacunas y 48,1 % ovinas) y 91% en el grupo IV (37,6 % vacunas y 53,4 % ovinas), las cepas con las características de los grupos V y VI carecieron de una fuente específica de origen.

De acuerdo a lo expresado anteriormente, la segunda parte del presente trabajo trata, con una técnica similar a la utilizada por Cooper y Ramadan, de establecer una clasificación comparativa entre los cultivos de estreptococos aislados a partir de aguas de diferente procedencia de acuerdo a la identificación de las cepas aisladas y de acuerdo a su origen.

Basado en el paralelismo de ambas clasificaciones podría aplicarse ese método sencillo usado por Cooper y Ramadan para diferenciar en aguas, la contaminación de origen humano o animal

--- o o ---

II-ENSAYOS DE LA SENSIBILIDAD DE MEDIOS CON CIANURO DE SODIO

Se comenzó el estudio haciendo una serie de ensayos, tendientes a seleccionar entre varios medios adicionados con 25 mg. % de cianuro de sodio, el más sensible, para la apreciación de estreptococos.

Medios estudiados:

- a).- Medio glucosado (apéndice)
- b).- Medio Rothe
- c).- Medio Todd
- d).- Medio "A" (modificación del medio "S.F." de Hajna y Perry)

De acuerdo al trabajo de Balcazar de Aztegui y colaboradoras se procedió al agregado de cianuro de sodio en el medio glucosado y en el medio de Todd, en tanto que en los medios de Rothe y medio "A" se hizo el reemplazo de la azida sódica por el cianuro de sodio en la concentración antes mencionada.

Cultivos de prueba.-

Se aislaron estreptococos a partir de muestras de agua de río, sembrándose en un medio con azida sódica (Rothe). Se realizó una serie de pases, a placas con agar azida, y agar inclinado tendientes a la obtención de un cultivo puro. Se ratificó finalmente la pureza del mismo por una coloración de Gram.

Técnica seguida.-

Se partió de una suspensión del cultivo puro del estreptococo elegido, en agua estéril, realizándose luego sucesivas diluciones al décimo; simultáneamente, se sembraron placas con agar

nutritivo, dentro de ciertas diluciones, con el objeto de conocer el número de bacterias por ml. contenidas en cada dilución.

Los ensayos realizados, se efectuaron con aquellas diluciones que contenían de 2 a 20 bacterias por ml. según lo demuestran los cuadros Nº 1, 2, 3 y 4. Se sembraron tubos de cada medio con 1 ml. de las diferentes diluciones, incubándose a 37°C. y realizándose la lectura de los mismos a las 24 y 48 horas de incubación. Se ratificó el desarrollo de estroptococos de los tubos positivos mediante una coloración de Gram.

Resultados:

Los resultados logrados se consignan en los cuadros Nº 1, 2, 3 y 4 y la observación de los mismos, permite apreciar los siguientes hechos:

El reemplazo de la azida sódica en el medio de Rothe y en el medio "A" por el cianuro de sodio, no produjo una mayor sensibilidad en el medio, por el contrario, pareció inhibir algo el desarrollo del cultivo.

El agregado de cianuro de sodio al medio glucosado produjo un mayor desarrollo. Inversamente, el medio de Todd cianurado, acusó un retardo. Con una concentración de 15 - 20 bacterias, el desarrollo es perfecto para cualquiera de los medios utilizados.

Cuando se trabaja con una concentración de 4 bacterias promedio, el resultado ya no es tal, como lo demuestra el % de desarrollo que aparece en la última columna de los cuadros.

Los resultados obtenidos son más o menos concordantes para los diferentes medios ensayados; no encontrándose una evidente

superioridad en ninguno de ellos. No obstante, se ha elegido para el presente trabajo, el medio glucosado cianurado, por la simplicidad de su fórmula y menor costo, pudiendo ser empleado en análisis de rutina y el medio "A", uno de los medios últimamente estudiados (1953), que comparado con los demás medios, evidenció un desarrollo superior (mayor depósito y turbiedad) dentro de las 24 horas de incubación.

— • • —

CUADRO Nº 1

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO CON Y SIN CIANURO
DE SODIO

Medios	Nº bact. por tub.	Nº tub. sembr.	Desarrollo 37º		Colorac. Gram positivos	Desarroll. %
			24h.	48h.		
Todd	15-20	20	15 +++ 5 ++	20 +++	20	100
Todd Cianur.	15-20	20	10 +++ 10 ++	20 +++	20	100
Glucosado	15-20	20	20 +++	20 ++++	20	100
Gluc.Cian.	15-20	20	20 ++++	-	20	100
Todd	4-8	20	20 ++	20 +++	20	100
Todd Cianur.	4-8	20	10 ++ 10 +	20 +++	20	100
Glucosado	4-8	20	15 +++ 5 ++	20 ++++	20	100
Gluc. Cian.	4-8	20	18 +++ 2 ++	20 ++++	20	100

- ++++ : Escalante de óxido y turbiedad
- +++ : Buen " "
- ++ : Do. óxido
- + : Turbiedad

CUADRO N° 2

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO CON Y SIN CIANURO
DE SODIO

Medios	Nº bact. por tub.	Nº tub sembr.	Desarrollo		Colorac. Gram positivos	Desarroll %
			24h	37º 48h		
Todd	4-12	44	40++ 4+++	44+++	44	100
Todd Cianur.	4-12	44	20+++ 24++	44+++	44	100
Glucosado	4-12	44	12+++ 32++	44++++	44	100
Gluc.Cianur.	4-12	44	44+++	44++++	44	100

- ++++ : Excelente depósito y turbiedad
- +++ : Buen " "
- ++ : Depósito
- + : Turbiedad

CUADRO Nº 3

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO CON Y SIN CIANURO
DE SODIO

	.Nº bact. por tub.	Nº tub. seabr.	Desarrollo		Colorac. Gram positivos	Desarroll %		
			24h	37º 48h				
Glucosado	6	20	19 1	+++ ++	20	+++	20	100
Gluc.Cianur.	6	20	19 1	+++ +	20	++++	20	100
Rothe	6	20	20	+++	20	++++	20	100
Rothe Cianur.	6	20	19 1	+++ ++	20	++++	20	100
Medio " A "	6	20	19 1	++++ +++	20	++++	20	100
Medio "A"Cian.	6	20	19 1	++++ -	19	++++ +	20	100
Glucosado	3-4	40	34 3 3	+++ ++ +	37	++++	37	92,5
Gluc.Cianur.	3-4	40	35 2	++++ +++	38	++++ ++	39	97,5
Rothe	3-4	40	27 9	+++ ++	36	++++ +	38	95
Rothe Cianur.	3-4	40	28 10	+++ ++	38	+++ +	38	95
Medio " A "	3-4	40	38 2	++++ -	38	++++ +	40	100
Medio "A"Cian.	3-4	40	38 2	++++ -	38	++++ ++	39	97,5

++++ : Excelente depósito y turbiedad

+++ : Buen

++ : Depósito

+ : Turbiedad

CUADRO N° 4

ENSAYOS DE SENSIBILIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO CON Y SIN CIANURO
DE SODIO

Medios	.N° bact. por tub	N° tub. sembr. .	Desarrollo 37°		Colorac Gram .positivos	.Desarroll %
			. 24h	. 48h		
Todd	10-15	20	20+++	20+++	20	100
Todd Cianur.	10-15	20	20 ++	20 +++	20	100
Glucosado	10-15	20	20 +++	20++++	20	100
Gluc.Cianur.	10-15	20	20+++	20++++	20	100
Rothe	10-15	20	20+++	20++++	20	100
Rothe Cianur.	10-15	20	20+++	20++++	20	100
Medio " A "	10-15	20	20++++	20++++	20	100
Medio "A"Cian.	10-15	20	19+++ 1++	20++++	20	100
Todd	2-4	40	32+++ 8++	32++++ 8++	37	92,5
Todd Cianur.	2-4	40	20+++ 12++ 8+	32+++ 8++	36	90
Glucosado	2-4	40	30+++ 6++	35++++ 1+	36	90
Glucos.Cianur.	2-4	40	30+++ 8++	38++++	38	95

CUADRO N° 4 (continuación)

Medios	.Nº bact. por tub.	Nº tub sembr.	Desarrollo		Colorac. Gram .positivos	Desarro: %
			37° . 24h	. 48h.		
Rothe	2-4	40	34+++ 2++	34++++ 4++ 2+	38	95
Rothe Cianur.	2-4	40	27+++ 13++	30++++ 2+++ 8+	33	82,5
Medio " A "	2-4	40	36+++ 4+	38++++ 2+	38	95
Medio "A"Cian.	2-4	40	34+++ 6+	37++++ 3+	37	92,5

- ++++ : Excelente depósito y turbiedad
- +++ : Buen " "
- ++ : Depósito
- + : Turbiedad

III- ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE EL MEDIO GLUCOSADO CIANURADO
Y EL MEDIO "A" EN EL AISLAMIENTO DE ESTREPTOCOCOS

El estudio comparativo entre el medio glucosado cianurado y el medio "A" con el objeto de determinar sus cualidades para la investigación de estreptococos en agua, se efectuó examinando directamente muestras de agua del Río de la Plata (20), de pozos semisurgentes de Buenos Aires y poblaciones vecinas (56) y de natatorios (65). En total se examinaron 141 muestras y en todas ellas también se determinó el contenido en bacterias coliformes.

Aislamiento de estreptococos en agua de río.-

Por tratarse de aguas muy contaminadas se efectuaron diluciones decimales, sembrándose en este caso, tres tubos por cada dilución como se indica en el esquema siguiente:

3 tubos sembrados con 10	ml.	de muestra
" " " " 1		" "
" " " " 0,1		" "
" " " " 0,01		" "
" " " " 0,001		" "
" " " " 0,0001		" "

Se sembraron en total 60 tubos de cada dilución y de cada medio, que se incubaron a 37°C. durante 48 horas. Con material de todos aquellos tubos considerados positivos (depósito y turbiedad) se realizó una coloración de Gram, a fin de confirmar la presencia de estreptococos, procediéndose a aislar de algunos de estos cultivos, cepas de estreptococos mediante siembras en estría sobre placas de agar nutritivo. Una colonia aislada de cada placa fué sembra

da en caldo glucosado cianurado y luego de ratificar su pureza por una coloración de Gram, se procedió a conservar las cepas sembrándolas en tubos de agar inclinado y guardándolas en la cámara fría para su posterior clasificación.

Los resultados alcanzados; que se presentan en el cuadro Nº 5, muestran una mayor sensibilidad y selectividad del medio glucosado cianurado, cuando se examinan aguas marcadamente contaminadas. En efecto, sobre el total de 360 tubos, el medio cianurado indica un 67,7 % de tubos positivos comparado con un 63 % del medio "A". El % de tubos confirmados fué de 58,9 % para el medio glucosado cianurado mientras que para el medio "A" no pasó de 52,5 %.

Aislamiento de estreptococos en aguas de pozos y natatorios.-

Se procedió a la siembra de estas muestras empleándose las siguientes diluciones:

3	tubos	sembrados	con	10	ml.	de	muestra
"	"	"	"	1	"	"	"
"	"	"	"	0,1	"	"	"

La confirmación de los tubos positivos, el aislamiento de cepas y su conservación para la posterior clasificación, se llevaron a cabo con una técnica similar a la utilizada con las aguas de río.

Los resultados relativos a la sensibilidad y selectividad de los medios empleados frente a las muestras de pozos y natatorios están consignados en el cuadro Nº 6 y de su observación se establece que en aguas de pozos el medio cianurado posee una mayor sensibilidad, no obstante acusar un % mayor de tubos falso positivos que

el medio "A".

En muestras de natatorios ocurre lo contrario, el medio "A" demuestra mayor sensibilidad que el medio cianurado, dando un menor % de tubos falsos positivos.

En cuanto a la selectividad de los medios, en ambos tipos de agua, la coloración de Gram revela una mayor pureza en cultivos del medio "A".

Como ya se mencionó, en todas las muestras examinadas se determinó el número más probable de bacterias coliformes por 100 ml. y se hizo la diferenciación de los mismos en los grupos Esch.coli y bacilos intermediarios, aerógenos y cloacal; se procedió para ello de acuerdo a la técnica del Ministerio de Salud Pública de Inglaterra modificado por Wilson (39) y adoptado por los laboratorios de O.S.M. desde hace muchos años, cuyo fundamento es el siguiente: Porciones determinadas del agua en examen, se siembran en tubos con caldo Mac Conkey, que se incuban a 37°C. durante 48 horas. La formación de ácido y de gas indica la existencia de bacterias coliformes. Los tubos positivos se utilizan en su totalidad, para realizar pruebas: 1) tubos con caldo Mac Conkey que se incuban en baño de agua regulado exactamente a 44°C. ($\pm 0,5$) temperatura en la cual solo el B.coli fecal produce ácido y gas y 2) a tubos con medio citrato de Koser, que se incuban a 30°C. durante 72 horas. Este medio tiene como única fuente de carbono, citrato de sodio, y en él se desarrollan las bacterias coliformes del grupo I.A.C. Un cálculo permite determinar el número más probable (N.M.P.) de

bacterias coliformes totales, B. coli fecal tipo I y bacterias coliformes del grupo I.A.C.

Todos los datos referentes a la presencia de estreptococos y bacterias coliformes en los diversos tipos de aguas examinados se condensan en el cuadro N^o 7.

En aguas de río, todas las muestras analizadas han acusado la presencia de contaminación tanto de estreptococos como de Esch. coli existiendo por lo tanto un paralelismo en ambos tipos de contaminación.

En aguas de pozos, si bien se trabajó con aguas que habían dado ensayo presuntivo positivo de coliformes, solo se observó en un 84 % de los casos paralelismo entre la contaminación por coliformes y estreptococos. El % de muestras con Esch coli resultó menor que el de muestras con estreptococos.

En aguas de natatorios la falta de concordancia es mayor, ya que estreptococos y coliformes fueron hallados solo en el 80 % y 52 % respectivamente de las muestras examinadas, alcanzando apenas 15,4 % las muestras con Esch. coli.

Es evidente por lo tanto el mayor valor del índice de estreptococos sobre el de coliformes para juzgar la calidad bacteriológica de aguas de natatorios.

CUADRO Nº 5

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SENSIBILIDAD Y SELECTIVIDAD DEL MEDIO CIANURADO
Y DEL MEDIO "A" FRENTE A MUESTRAS DE AGUAS DEL RIO DE LA PLATA

	Medio cianurado		Medio " A "					
	sembr.	+ confir.fals.	sembr.	+ confir fals.				
Tubos sembrados con 10 ml.	60	58	2	60	60	57	3	
Tubos sembrados con 1 ml.	60	60	54	6	60	60	51	9
Tubos sembrados con 0,1 ml.	60	56	46	10	60	52	38	14
Tubos sembrados con 0,01 ml.	60	39	32	7	60	39	32	7
Tubos sembrados con 0,001ml.	60	24	17	7	60	12	9	3
Tubos sembrados con 0,0001ml.	60	5	5	0	60	4	2	2
Total de tubos	360	244	212	32	360	227	189	38
Resultados totales %	-	67,7	58,9	8,8	-	63	52,5	10,5

CUADRO Nº 6

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA SENSIBILIDAD Y SELECTIVIDAD DEL MEDIO CIAMURADO Y DEL MEDIO "A"

FRENTE A MUESTRAS DE AGUAS DE POZOS Y NATATORIOS

	Agua de pozos semisur.		Agua de natatorios		Ambas procedencias							
	Medio CNNA total %	Medio "A" total %	Medio CNNA total %	Medio "A" total %	Medio CNNA total %	Medio "A" total %						
Tubos sembrados con 10m.	168	-	168	-	180	-	348	-				
Tubos positivos	156	92,8	137	77,3	161	89,4	146	81,1	317	91	283	81,3
Tubos confirmados	127	75,5	126	69	100	55,5	129	71,6	227	65,2	245	70,4
Tubos falsos positivos	29	17,2	21	12,5	61	33,8	17	9,4	90	25	38	10,9
Tubos sembrados con 1 ml.	56	-	56	-	60	6	60	-	116	-	116	-
Tubos positivos	25	44,6	22	39,2	30	50	24	40	55	47,4	46	39,6
Tubos confirmados	18	32	18	32,1	19	31,6	19	31,6	37	31,8	37	31,8
Tubos falsos positivos	7	12,5	4	7,1	11	18,3	5	8,3	18	15,5	9	7,7

CUADRO No 7

RELACION ENTRE LA CONTAMINACION POR ESTREPTOCOCOS, COLIFORMES Y ESCH. COLI

EN DIFERENTES TIPOS DE AGUA

Tipo de agua	No muestras	Estreptococos		Coliformes		Esch. Coli	
		positiv. %	positiv	positiv %	positiv	positiv %	positiv %
Río	20	100	20	100	20	100	20
Pozos (x)	56	83,9	56	100	17	30,3	
Natatorios	65	80	34	52,3	10	15,4	

(x): Se partió de muestras cuyo ensayo presuntivo de B.coliformes, dió resultado positivo

IV - CLASIFICACION DE LAS CEPAS DE ESTREPTOCOCOS

La clasificación de las diferentes cepas aisladas se llevó a cabo de acuerdo con las técnicas seguidas por K.C. Cooper y Ramadan.

CLASIFICACION (a)

De las cepas de estreptococos aisladas y conservadas en tubos de agar inclinado, se efectuaron pases a tubos de caldo bacto peptona y luego de una incubación de 16 horas a 37°C., se efectuaron las siembras en los siguientes medios diferenciales (ver apéndice) Los ensayos realizados fueron los siguientes:

1).- Licuação de la gelatina.-

Se sembró cada una de las cepas aisladas por punción en tubos conteniendo un medio con gelatina, luego de una incubación de 14 días a la temperatura ambiente se efectuó la observación, habiendo desarrollo filiforme en todas los tubos y licuação de la gelatina solo en algunos de ellos.

2).- Fermentación de azúcares.-

De cada uno de los tubos de bacto-peptona a clasificar sembróse un ansa (4mm) en tubos conteniendo 5 ml. de los diferentes azúcares: lactosa, manitol, sacarosa, rafinosa, inulina, glicerina y sorbitol, realizándose la observación luego de 24 y 48 horas de incubación a 37°C. La mayoría de los tubos que dieron reacción positiva lo hicieron dentro de las primeras 24 horas. Los tubos sembrados con lactosa dieron todos reacción positiva.

3).- Leche azul de metileno.-

Se sembró un ansa de los cultivos a clasificar, en tubos conteniendo 4 ml. de leche azul de metileno. Se incubó éstos en baño de agua a 37°C. durante 24 horas. La reacción fué considerada positiva cuando los tubos presentaron reducción parcial (color celeste) o reducción total (color blanco)

4).- Leche tornasolada.-

Al igual que en el ensayo realizado con la leche azul de metileno, se sembró un ansa de cada uno de los cultivos en tubos conteniendo 4 ml. de leche tornasolada. Luego de incubado en baño de agua a 37°C. durante 24 horas, se hizo la lectura, considerándo positivos aquellos tubos que dieron reducción parcial (color rosa) o reducción total (blanco).

5).- Hidrólisis del almidón.-

El ensayo para la hidrólisis del almidón se llevó a cabo sembrándose en superficie, placas de agar con 0,2 % de almidón soluble. Las placas se incubaron a 37°C. durante 5 días; al cabo de ese tiempo se efectuó la reacción para determinar la hidrólisis cubriendo la superficie de la placa con solución de Lugol. En ningún caso se observó reacción positiva.

6).- Desarrollo en 6,5 % de ClNa.-

La siembra se realizó en superficie, incubándose las placas conteniendo 6,5 % de ClNa durante 48 horas a 37°C. En la mayoría de las muestras se observó desarrollo de colonias.

7).- Hemólisis.-

Se procedió de acuerdo con la técnica de Brown. Se sembró

en profundidad, colocando 1 ml. del cultivo de bacto poptona de 16 horas de incubación, en placas y luego se agregó a cada una de ellas el agar fundido al que previamente se agregó 5 % de sangre de caballo; se mezcló el cultivo con el medio y se dejó enfriar. Las placas secas se incubaron en posición invertida a 37°C. durante 24 horas; luego de examinadas se dejaron 24 horas más, efectuándose la lectura final. Se consideraron positivos todas aquellas placas cuyas colonias presentaron hemólisis a su alrededor.

8).- Resistencia a 60°C.-

De acuerdo con la técnica seguida en el trabajo de Cooper y Ramadan, se colocaron 0,5 ml. de cada cultivo en pequeños tubos de ensayo, manteniéndose durante media hora a una temperatura de 60°C. en baño maría y llevándose luego a un baño de 37°C. durante 2 horas. Se comprobó su resistencia al calor sembrándose en estria en placas de agar sangre al 10 % e incubando a 37°C. durante 48 horas.

9).- Desarrollo en bilis.-

Se sembró en caldo bilis al 10 % incubándose a 37°C. durante 48 horas. Fueron considerados positivos aquellos tubos que presentaron turbidez y precipitado.

10).- Hidrólisis del hipurato de sodio.-

Los estreptococos hidrolizan el hipurato de sodio transformándolo en ácido benzoico y glicocola.

La presencia de ácido benzoico en el medio, puede ser demostrada realizando el ensayo del Cl_3Fe o de un ácido inorgánico. Se efectuó el del Cl_3Fe por ser el más sensible de los dos.

Se sembró un ansa de cada cultivo en bacto peptona en un medio conteniendo hipurato de sodio y luego de incubado durante 48 horas a 37°C. se procedió al ensayo del Cl₃Fe.

Se agregó a 2ml. del medio utilizado, 0,5 ml. de solución de Cl₃Fe al 7 % y se agitó enérgicamente. La permanencia de un precipitado en la mezcla, significa que el hipurato se desdobló en benzoato y glicocola, mientras que si la mezcla quedó clara dentro de los 5 a 10 minutos, el hipurato no ha sido hidrolizado.

11).- Crecimiento a pH 9,6.-

El medio correspondiente fué inoculado con dos ansas de cada uno de los cultivos en bacto peptona. Se incubó durante 24 horas a 30°C y se realizó la lectura correspondiente. El pH inicial del medio debe ser 9,6 (\pm 0,02) y no debe variar durante la incubación en (\pm 0,04 unidades). Debe asegurarse que la temperatura del medio al determinar el pH sea de 18°C.

Se sembraron tubos control con caldo dextrosa y "buffer" ajustando a pH 7 incubándose con cada una de las cepas examinadas. También se incluyeron en cada ensayo controles negativos.

La clasificación de las diversas cepas de estreptococos estudiadas con las técnicas mencionadas, se consigna en los cuadros Nº 8, 9 y 10. Estos resultados no concuerdan en su totalidad con los obtenidos por Cooper y Ramadan.

La determinación de algunas cepas varió en una o dos reacciones, se observó un comportamiento anormal, por ejemplo, en va-

rias cepas que se consideraron pertenecientes a los Str atípico II y III, con respecto al tornasol, sorbitol y resistencia a 60°C. especialmente en las aguas de río y natatorios. Similarmente, el Str. atípico V se presentó anormal a la reacción de hidrólisis del hipurato en los tres tipos de agua y el Str. durans en el desarrollo a pH 9,6 y la prueba de hemólisis.

En aguas de pozos, varias cepas no respondieron satisfactoriamente a las reacciones del azul de metileno. Por el contrario en aguas de río y natatorios, las reacciones fueron normales.

A fin de establecer en base a esta clasificación, el origen posible de las cepas estudiadas, de acuerdo a lo establecido por Cooper y Ramadan se consideró al Str. faecalis típico y al Str. durans de origen exclusivamente humano, al Str. atípico III, IV, V y Str. bovis, de origen animal exclusivo y al Str. atípico I, II y Str. liquefaciens de origen humano-animal.

Con los datos obtenidos se construyó el cuadro N° 11 en el que aparece la distribución de las cepas de acuerdo a su origen. En él se observó que las aguas de río presentaron una contaminación de origen animal muy superior a la humana, en aguas de pozos predominó la contaminación de origen humano. En cuanto a las aguas de natatorios presentaron igual % de contaminación de origen humano y animal.

— o o —

CLASIFICACION (b)

Simultáneamente con los ensayos realizados con el objeto de clasificar las diferentes cepas de estreptococos aisladas, se efectuaron otros destinados a determinar el origen, humano o animal de la contaminación de las muestras en estudio, conforme a las pruebas propuestas también por Cooper y Ramadan con el mismo fin.

Se utilizaron los tubos de cultivos en bacto peptona de 16 horas de incubación, usados para la clasificación anterior, realizándose los siguientes ensayos:

1).- Resistencia al calor 63°C.-

Luego de someter 0,5 ml. del cultivo de 16 horas, de cada una de las cepas a clasificar, a la temperatura de 63°C. durante 30 minutos y dos horas a 37°C. en baño maría, se sembró un ansa del cultivo, en estría en placas de agar sangre al 10 % y se efectuó la observación luego de una incubación de 48 horas a la temperatura de 37°C.

2).- Resistencia al calor y al telurito.-

De los tubos expuestos a la temperatura de 63°C., se sembró en estría en placas con medio de Todd sólido (se utilizó medio de Todd sólido, en reemplazo del medio de McLeod's utilizado en el trabajo de Cooper y Ramadan), con 0,04% de telurito de potasio. Se incubó a 37°C. durante 48 horas. La presencia de colonias negras indicó reacción positiva.

3).- Reacción Verde B. de Janus.-

Un ansa (4 mm) del cultivo en caldo bacto peptona de 16

horas de incubación, se sembró en el medio verde Janus con una concentración de 1/10.000. Se incubó durante 16 horas en baño de 37°C.

Se estableció que el verde Janus se reduce en el siguiente orden de coloración; azul, malva, violeta, rojo oscuro, rojo vino (quinónico) rosa, rosa pálido e incoloro. En este ensayo se consideran como tubos positivos aquellos en los cuales se observa el color rojo quinónico (forma semireducida) o cualquier otro color que siga a la obtención del compuesto leucoforme; siendo el color rosa el más a menudo observado.

Los tubos tendrán reacción negativa cuando el color esté comprendido entre el azul y el rojo oscuro. Para evitar confusión entre el rojo oscuro y el rojo quinónico, los cultivos son agitados antes de examinarse, puesto que el O₂ atmosférico devolverá el color violeta al colorante si no se halla en la forma quinónica.

En las observaciones efectuadas en este trabajo, se consideró positivos los tubos con coloración; rosa, rosa claro, e incoloro.

Los resultados alcanzados también se representan en los cuadros Nº 8, 9 y 10. En ellos, de acuerdo a Cooper y Ramadan se clasificó a las cepas en 6 grupos considerando:

Los grupos I y II	de origen exclusivamente humano
" " III y IV	" " " animal
" " V y VI	" " " humano y animal

En el cuadro Nº 12 se presentan estos mismos resultados en relación con el tipo de agua, pudiendo observarse en las aguas

de río una mayor contaminación de origen animal (42 %) que humano (5,3 %) y un elevado porcentaje de cepas a las que se asigna ambos orígenes (52,7 %). En cambio en aguas de pozos semisurgentes y natorios predomina la contaminación de origen humano.



CUADRO N.º 8

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE E. TRETX CAS ALABIDA DEL AGUA DEL RIO DELA LATA

FOR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

**FOR ORIGIN (b)
humano o animal**

Cultivos	Lic. Gelatina	Kantrol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Botulino	H. Alabida	Hemolis	Resist. 60º	Resist. CINA	Res. Formol	Hidr. Hiperato	Lactosa	Desar. Bils	Desar. pH 9,6	Clasificación	Leche V. Jenuis	Resist. 63º	Res. Tejuto y color	Clasificación	
1	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	S. atipico II	+	+	-	-	Grupo V
2	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	-	-	Grupo IV
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	⊕	+	+	+	-	S. durans	+	+	-	-	Grupo V
4	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	-	-	-	Grupo III
5	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	+	+	-	-	Grupo V
6	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	-	-	Grupo IV
7	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV
8	-	+	+	-	-	-	⊖	*	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atipico II	-	-	-	-	Grupo III
9	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	-	-	Grupo IV
10	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV
11	-	+	+	-	-	-	⊖	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	-	-	Grupo IV
12	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV
13	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE LAS PLANTAS ALIADAS DEL RIO DE LA PLATA

PAR IDENTIFICACION DE CE. AS (a)

ORIGEN (b)
humano o animal

CULTIVOS	Lic. Colatina	Leucotoi	Saccharosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Arbitol	Amortilleno	B. Almidon	Hemulin	Novist. 600	Novist. CMA	Nov. Formol	Blas. Almidon	Lactosa	Novist. Billa	Novist. PR 9.6	Clasificacion	Leche A. Janna	Novist. 630	Nov. Tolaito	Novist. 7 error	Clasificacion
14	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	-	Grupo VI
15	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V
16	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	-	Grupo VI
17	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico II	+	-	-	-	Grupo VI
18	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	-	Grupo VI
19	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V
20	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V
21	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	-	Grupo VI
22	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV
23	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V
24	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	-	Grupo VI
25	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV
26	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	-	Grupo V
27	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	-	-	Grupo IV

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ESTREPTOCOCCOS AISLADOS DEL AGUA DEL RIO DE LA PLATA

POR IDENTIFICACION DE CEDIAS (a)

POR ORIGEN (b)
humano o animal

Cultivos	Ic. Gelatina	Mentol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	H. Almidon	Hemolis	Resist. 60°	Resist. CIMA	Red. Formosol	Hidr. Hipurato	Lactosa	Desarr. Bilis	Desarr. pH 9,6	Clasificacion	Leche V. Janus	Resist. 63°	Res. Tejurto y calor	Clasificacion
28	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	⊖	+	+	+	S. liquefaciens	+	+	-	Grupo V
29	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	-	Grupo V
30	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	-	-	Grupo III
31	-	+	+	-	-	-	⊖	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	+	Grupo II
32	-	-	+	+	⊖	-	-	-	⊖	-	-	-	-	-	+	+	-	S. bovis	+	+	-	Grupo V
33	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	⊖	+	+	+	S. atipico V	+	+	+	Grupo I
34	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	⊖	+	+	+	S. atipico V	-	+	-	Grupo IV
35	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	⊖	+	+	+	S. atipico V	+	+	-	Grupo V
36	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	-	-	-	Grupo III
37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	⊕	⊕	S. durans	+	-	-	Grupo VI
38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	⊕	⊕	S. durans	+	-	-	Grupo VI

○ Resultados opuestos a los del tipo correspondiente.-

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ESTREPTOCOCCOS AISLADOS DE AGUAS DE POZOS

POR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

POR ORIGEN (b)
humano o animal

Cultivos	Iso. Gelatina	Mantol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	H. Almidon	Hemólisis	Resist. 60°	Resist. CINA	Red. Formosol	Hidr. Hipurato	Lactosa	Desarr. Bilis	Desarr. pH 9,6	Clasificación	Leche Estéril	Resist. 63°	Res. Telurito y calor	Clasificación	
1	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
2	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
3	-	+	+	-	-	+	+	⊖	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	-	-	-	Grupo VI
4	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	⊖	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	+	Grupo I
5	-	+	+	-	-	+	⊖	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
6	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	+	Grupo I
7	-	+	+	+	+	+	⊖	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	-	-	-	Grupo VI
8	-	+	+	+	+	+	⊖	+	-	⊖	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	+	Grupo I
9	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	⊕	S. durans	+	-	-	-	Grupo VI
10	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	⊕	⊖	⊖	+	+	+	S. atípico V	-	-	-	-	Grupo III
11	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	⊕	+	+	+	S. atípico II	+	+	+	+	Grupo I
12	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	S. durans	+	+	+	+	Grupo I
14	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ESTREPTOCOCCOS AISLADOS DE AGUAS DE POZOS

POR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

POR ORIGEN (b)
humano o animal

Cultivos	Ile. Gelatina	Mantol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	Hidr. Almidon	Hemólisis	Resist. 60°	Resist. 51°	Red. Formosol	Hidr. Hipurato	Lactosa	Desaz. Bilis	Desaz. pH 9,6	Clasificación	Leche V. Jannus	Resist. 63°	Res. Telurito y calor	Clasificación	
29	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	+	Grupo I
30	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
31	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	+	Grupo I
32	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
33	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
34	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	S. durans	+	+	+	+	Grupo I
35	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
36	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
37	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	S. atípico III	+	+	-	-	Grupo V
38	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	S. atípico II	+	-	-	-	Grupo VI
39	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	S. durans	+	+	+	+	Grupo I
40	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	-	-	-	Grupo VI

O : Resultados opuestos a los del tipo correspondiente

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ESTREPTOCOCCOS AISLADOS DEL AGUA DE NATATORIOS

POR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

POR ORIGEN (b)
humano o animal

Cultivos	Ic. gelatina	Mentol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	H. Almidon	Hemólisis	Resist. 60°	Resist. CINA	Red. Tomazol	Hgr. Hipurato	Lactosa	Desarr. Bilis	Desarr. pH 9,6	Clasificación	Teche V. Janus	Resist. 63°	Res. Telurito y color	Clasificación	
1	-	+	+	-	-	+	⓪	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atípico I	-	-	-	-	Grupo III
2	+	+	+	-	-	+	+	+	-	⓪	+	+	+	+	+	+	+	S. zymegenes	+	-	-	-	Grupo VI
3	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	⓪	+	+	+	S. atípico V	+	+	-	-	Grupo V
4	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
5	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	S. atípico V	-	+	-	-	Grupo IV
6	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	+	Grupo I
7	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	S. atípico III	-	-	-	-	Grupo III
8	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	⓪	-	+	+	+	S. atípico III	-	+	-	-	Grupo IV
9	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	S. atípico II	+	-	-	-	Grupo VI
10	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atípico II	+	-	-	-	Grupo VI
11	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	S. atípico V	-	-	-	-	Grupo III
12	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atípico III	-	-	-	-	Grupo III
13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	⓪	+	+	-	+	+	+	+	S. durans	+	+	+	+	Grupo I

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ESTREPTOCOCCOS AISLADOS DEL AGUA DE NATATORIOS

POR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

FOR ORIGEN (b)
h umano o animal

Cultivos	Ico. Gelatina	Mentol	Sacarosa	Rafinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	H. Almidon	Hemólisis	Resist. 60°	Resist. CMA	Red. Formosol	Hidr. Hipurato	Lactosa	Desarr. Bilis	Desarr. pH 9.6	Clasificación	Lecne V. Janus	Resist. 63°	Res. Tolurto y calor	Clasificación
14	-	+	+	-	-	-	⊕	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atipico II	+	+	+	Grupo I
15	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
16	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
17	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
18	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
19	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
20	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	-	-	Grupo VI
21	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	-	-	-	Grupo III
22	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
23	-	+	+	-	-	⊕	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
24	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	+	-	-	Grupo VI
25	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atipico III	-	+	+	Grupo II
26	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	+	Grupo I

CLASIFICACION DE CULTIVOS DE ENTEROCOCOS AISLADOS DEL AGUA DE LABORATORIOS

POR IDENTIFICACION DE CEPAS (a)

POR ORIGEN (b)
humano o animal

Cultivos	Lic. Gelatina	Mentol	Sucrosa	Relinosa	Inulina	Glicerina	Sorbitol	A. Metileno	H. Almidon	Hemólisis	Resist. 60°	Resist. 12MA	Rel. Formosol	Hidr. Hipurato	Lactosa	Desarr. Bilis	Desarr. pH 9,6	Clasificación	Leche V. durans	Resist. 63°	Res. Telurito y calor	Clasificación
27	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atipico II	+	+	+	Grupo I
28	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	⊖	-	+	+	+	S. atipico III	+	-	-	Grupo VI
29	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico III	+	+	+	Grupo I
30	-	+	+	-	-	-	⊕	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	+	+	+	Grupo I
31	-	+	+	-	-	-	⊕	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	-	+	+	Grupo II
32	-	+	+	-	-	-	⊕	-	-	-	+	+	⊕	-	+	+	+	S. atipico II	+	-	-	Grupo VI
33	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	S. atipico II	-	-	-	Grupo III
34	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
35	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	Grupo I
36	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	S. faecalis	+	+	+	Grupo I
37	-	-	+	-	-	-	-	-	-	⊕	+	+	+	-	+	⊕	+	S. durans	+	+	+	Grupo I
38	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	S. zymogenes	+	+	+	Grupo I
39	-	-	+	-	-	⊕	-	+	-	-	+	+	⊕	+	+	+	+	S. atipico V	+	+	-	Grupo V
40	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	S. durans	+	+	+	Grupo I

CUADRO Nº 11

CUADRO COMPARATIVO DE LA CONTAMINACION SEGUN SU ORIGEN BASADO

EN LA CLASIFICACION (a) DE LOS CUADROS 8-9 Y 10

Origen	38 cepas de Río cepas	%	40 cepas de Pozos cepas	%	50 cepas de Natat. cepas	%
Humano	3	7.8	21	52.5	17	34
Animal	24	63.2	7	17.5	16	32
Humano-Animal	11	29	12	30	17	34

CUADRO COMPARATIVO DE LA CONTAMINACION SEGUN SU ORIGEN BASADO

EN LA CLASIFICACION (b) DE LOS CHAYOTES 8-2 Y 10

Origen	38 cepas de rfo	40 cepas de Pozo	50 cepas de Matat.			
	cepas	%	cepas	%	cepas	%
Humano	2	5.3	26	65	27	54
Animal	16	42	4	10	12	24
Humano-Animal	20	52.7	10	25	11	22

V- RESUMEN Y CONCLUSIONES

- 1).- Se ha ensayado la adición de cianuro de sodio a diversos medios apropiados para el desarrollo de estreptococos determinando la sensibilidad de los mismos frente a diluciones de cultivos puros de estreptococos.
- 2).- Los medios probados fueron el caldo glucosado y el caldo de Todd; y el medio de Rothe y otro denominado medio "A", que es una modificación del medio "S.F." de Hajna y Perry, en los cuales se reemplazó la azida sódica por el cianuro de sodio.
- 3).- No se observó diferencias marcadas en la sensibilidad de dichos medios por lo que se adoptó, por su simplicidad, el caldo glucosado adicionado con 25 mg. % de cianuro de sodio para emplearlo en la investigación de estreptococos en aguas.
- 4).- Se estudió la eficacia del medio glucosado cianurado comparativamente con la del medio "A" examinando 20 muestras de agua del Río de la Plata, 56 de pozos semisurgentes y 65 de natatorios.
- 5).- El medio glucosado cianurado resultó ser algo más sensible aunque menos selectivo que el medio "A" con azida, frente a aguas de río y pozos y menos sensible y selectivo frente a aguas de natatorios. No se aconseja por lo tanto emplearlo en sustitución de los medios a base de azida bien conocidos.
- 6).- Se determinó paralelamente la presencia de bacterias coliformes en todas las muestras examinadas hallándose con relación al número de muestras estreptococos positivas igual cantidad de muestras

de pozos coliformes positivas y considerablemente menos aguas de natatorios coliformes positivas. Además en aguas de pozos y natatorios el % de muestras con Eschi. coli resultó muy inferior al de muestras con estreptococos.

7).- Se estudiaron siguiendo las técnicas propuestas por Copper y Ramadan 128 cultivos puros de estreptococos aislados de las diversas muestras examinadas, con el objeto de establecer el origen humano o animal de los mismos. Los cultivos de estreptococos aislados, fueron clasificados: por identificación de cepas (a) y por origen de contaminación (b).

8).- Los resultados alcanzados por los ensayos bioquímicos en la clasificación de estreptococos por identificación de cepas (a) no concordaron totalmente con los hallados por Cooper y Ramadan; algunas cepas se apartaron en una o más reacciones de su comportamiento normal.

9).- Distribuidas las cepas identificadas por (a) de acuerdo a su origen, se observó un predominio en aguas de río, de estreptococos de origen animal; en aguas de pozos de origen humano y en aguas de natatorios igual porcentaje de cepas de origen humano y animal

10).- En los resultados alcanzados en la clasificación de estreptococos por origen de contaminación (b) se obtuvo también un predominio, en aguas de río de estreptococos de origen animal; en aguas de pozos y natatorios predominaron las contaminaciones de origen humano.

11).- Comparadas ambas clasificaciones (a) y (b) se observó un resultado aproximado en el origen de las cepas, en aguas de río y pozos. En aguas de natatorios hubo una mayor discrepancia.

12).- Dada la simplicidad del método para establecer el origen de la contaminación (b) y el paralelismo obtenido en relación a la clasificación por cepas (a) sería posible determinar por medio de la clasificación (b) la naturaleza de la contaminación por estreptococos en aguas de diferente origen.

--- o o ---

VI - APENDICE

COMPOSICION Y PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVOS

Medio de Todd sólido (3).-

Fórmula:	Infusión de corazón	1000 ml.
	Neopeptona	10 g.
	ClNa	5 g.

Ajustar la ración con NaOH N/1 a pH 8,4. Hervir durante 5 minutos y agregar a 2 % de agar en polvo. Dejar en la marmita 1 hora a 1 1/2 hora de modo de fundir el agar y facilitar la filtración. Filtrar a través de algodón y distribuir en frascos. Esterilizar en el autoclave 20 minutos a 116°C. El pH final debe ser de 7,8.

Medio de Todd líquido (3).-

Fórmula :	Infusión de corazón	1000 ml.
	Neopeptona	20 g.
	ClNa	2 g.
	CO ₃ HNa	2 g.
	PO ₄ HNa ₂	0,4 g.
	Glucosa	2 g.

Preparación : Sacar la mayor cantidad de grasa de un corazón de vaca. Picar la carne en máquina y agregar 1050 cc. de agua por cada libra de carne. Agitar y retirar con espátula las pequeñas partículas de grasa que quedan en la superficie. Poner la mezcla de agua y carne en la heladera durante una noche. A la mañana siguiente calentar durante media hora a una temperatura de 85°C. Filtrar por papel. Agregar neopeptona y ajustar el pH a 8,0 con NaOH N. y agregar el resto de los componentes.

Hervir durante 15 minutos y filtrar a través de papel. Entubar en porciones de 10 ml. y esterilizar en autoclave durante 1 hora tres días sucesivos. El pH final debe ser 7,8.

Medio de Rothe (simple) (21).-

Fórmula :	Triptosa	15 g.
	Extracto de carne	4,5 g.
	Dextrosa	15 g.
	ClNa	15 g.
	Azida sódica	0,2 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Calentar los componentes hasta disolución. Agregar la dextrosa y la azida sódica. Filtrar por papel. Ajustar el pH a 7,2 con NaOH N. Colocar en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave a 110°C. durante 15 minutos.

Medio " A " (simple) (23).-

Fórmula :	Triptosa	20 g.
	Dextrosa	15 g.
	ClNa	5 g.
	PO ⁴ HK ₂	2,7 g.
	PO ⁴ H ₂ K	2,7 g.
	Azida sódica	0,2 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Calentar los componentes hasta disolución. Agregar la dextrosa y la azida sódica. Filtrar por papel. Ajustar el pH a 7,2 con NaOH N. Colocar en tubos de ensayo y esterilizar en autoclave a 110°C

durante 15 minutos.

Gelatina nutritiva (41).-

Fórmula :	Extracto de carne	3	g.
	Peptona	5	g.
	Gelatina	120	g.
	Agua destilada c.s	1000	ml.

Calentar en el esterilizador a vapor hasta disolución, dejar enfriar hasta 30°C. y ajustar el pH a 7,6 - 7,8. Agregar un tercio de clara de huevo por cada litro de medio, calentar a fuego directo hasta ebullición y filtrar en caliente por papel de filtro. Dejar enfriar hasta 30°C. y ajustar el pH a 7,2. Se distribuye en tubos a razón de 10 ml. esterilizando en autoclave a 110°C. durante 15 minutos. Enfriar rápidamente. Este medio deberá ser perfectamente limpio y tener un pH de 7,2 a la temperatura ambiente.

Leche tornasolada (41).-

Dejar en la heladera durante 18 horas, leche fresca cruda de buena calidad. Retirar la crema y agregar luego 10 % de solución de tintura de tornasol con lo que se obtiene un color azul púrpura. Colocar en tubos de ensayo y esterilizar a 100°C. durante 30 minutos tres días consecutivos.

Leche azul de metileno (41).-

Leche desengrasada con 0,1 % de azul de metileno. Entubar y esterilizar como en el caso anterior.

Leche verde B. de Janus (31).-

Preparar una solución del colorante verde de Janus en agua

destilada (dimetil safranina azodimetil anilina) al 1%, calentando en baño maría a 80°C. durante 15 minutos. Agregar a la leche desengrasada estéril en una concentración de 1/10.000. Distribuir 5 ml. en tubos pequeños de 10 ml.

Caldo nutritivo (caldo bacto peptona) (42).-

Fórmula :	Extracto de carne	6	g.
	Peptona	10	g.
	Agua destilada c.s.	1000	ml.

Calentar lentamente y agitando, en baño maría a 65°C. hasta disolución del extracto de carne y de la peptona. Recuperar el volumen perdido, agregando agua destilada y ajustar el pH en forma tal que después de la esterilización se halle comprendido entre 6,4 y 7,0 preferiblemente 6,9 (azul de bromo timol). Llevar a ebullición a llama directa y luego dejar enfriar hasta 25 °C. Recuperar nuevamente el peso perdido con agua destilada y clarificar por filtración a través de papel de filtro.

Distribuir en envases deseados y esterilizar en autoclave a 120°C. durante 15 minutos.

Agar nutritivo (43).-

Fórmula :	Extracto de carne	3	g.
	Peptona	5	g.
	Agar	15	g.
	Agua destilada c.s	1000	ml.

Disolver el extracto de carne y la peptona en el agua desti

lada calentando en esterilizador a vapor. Ajustar la reacción (a la temperatura ambiente) a un pH 7,4 (rojo fenol). Cortar el agar si es necesario, colocarlo en un saco de gasa o móseline y lavarlo en una corriente de agua durante 15 minutos. Una vez bien escurrido se agrega a la solución de peptona y extracto de carne y se lleva a autoclave a 120°C. durante 20 minutos, filtrándose en caliente. Distribuir en tubos o frascos y esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 120°C. La reacción final a la temperatura ambiente, deberá ser pH 7,2.

Medio para determinar la hidrólisis del almidón. (43).-

Se usa agar nutritivo al cual se agrega antes de esterilizar 0,2 % de almidón soluble. Se procede luego a su esterilización en forma similar a la preparación del agar nutritivo. El medio estéril se vierte en placas.

Inhibición por 6,5 % de ClNa (43).-

Se usa agar extracto de carne al cual se le agrega antes de ser esterilizado 6,5 % de ClNa. Esterilizado el medio se coloca en placas.

Caldo bilis (42).-

Caldo nutritivo con 10 % de bilis pura. Se entuba en porciones de 10 ml.

Hipurato de sodio (44).-

Fórmula :	Peptona	10 g.
	Pepsina	5 g.
	Cl ₂ Ca	0,03 g.

Hipurato de sodio	10 g.
Cl ₃ Fe al 1%	1 gota
Agua destilada c.s.	1000 ml.

Se disuelve en el agua la peptona, pepsina y el Cl₃Fe calentando a ebullición, se deja enfriar y agrega luego el hipurato, filtrar y ajustar el pH. Se esteriliza en autoclave 20 minutos a 116°C. Ajustar el pH a 7,1

Crecimiento a pH 9,6 (45).-

Fórmula : 1) Caldo dextrosa

Dextrosa	10 g.
Extracto de carne	10 g.
Peptona	10 g.
ClNa	5 g.
Agua destilada c.s.	1000 ml.

Ajustar el pH a 7,0 . Esterilizar en autoclave 20 minutos.

2) Solución buffer.

Glicocola	7,505 g.
ClNa	5,85 g.
Agua destilada	1000 ml.

Mezclar 6 partes de la solución (2) con 4 partes de NaOH N₁₀. A 900 ml. de medio (1) agregar 100 ml. del medio (2) y ajustar el pH a 9,8 con NaOH N₁₀; guardar en frasco cerrado durante una noche para precipitar completamente. Distribuir con precaución en tubos chicos dejando el mínimo de espacio libre.

Este medio debe usarse dentro de las 48 horas. Es esencial

que el pH sea determinado electrométricamente antes y después de la incubación, debiendo existir una diferencia de solo 0,04 unidades.

Medio de telurito (3).-

Se usó medio de Todd sólido al que se agregó antes de verter en placas, 0,04 % de telurito de potasio.

Agar sangre al 10 % (43).-

Se agrega al agar nutritivo 10 % de sangre de caballo, estéril, antes de verter el medio en placas de petri.

Caldo glucosado al 1 % (41).-

Fórmula :	Extracto de carne	3 g.
	Glucosa	10 g.
	Peptona	5 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Disolver la peptona y el extracto de carne en caliente, enfriar un poco y filtrar. Agregar la glucosa. Esterilizar y ajustar el pH a 7,4 - 7,8.

Medios cianurados.-

La preparación de los medios cianurados de Todd, Rothe, medio "A" y glucosado se efectúa agregando 25 mg % de cianuro de sodio una vez que el medio ha sido esterilizado, momentos antes de ser usado, distribuyéndose luego en los tubos que ya contienen la muestra a investigar. El cierre de los tubos debe ser hermético para evitar el desprendimiento de CNH (tapones de corcho o goma parafinados).

Fermentación de hidratos de carbono (41).-

Indicador de Andrade.

Fórmula :	Fucsina ácida	0,5 g.
	Agua destilada	100 ml.
	NaOH N/l	20 ml.

Disolver la fucsina en el agua. Agregar el álcali y dejar a la temperatura ambiente durante la noche. Filtrar por papel de filtro.

Agua de peptona (46).-

Fórmula :	Peptona	10 g.
	ClNa	5 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Disolver la peptona y el ClNa en el agua calentando en esterilizador a vapor. Filtrar en calicete a través de papel y ajustar el pH a 6,8 - 7,0. Agregar el indicador de Andrade 1 % y esterilizar a 120°C. durante 20 minutos. Preparar en agua destilada una solución del azúcar deseada al 10% y esterilizar a 100°C. durante 30 minutos. Agregar asepticamente 5 ml. de la solución de azúcar a 100 ml. de agua de peptona con indicador de Andrade. Repartir en tubos de ensayo con campanita (tubo de Durham) y esterilizar a 100°C durante 30 minutos. El medio deberá tener un pH de 7,4 - 7,6.

Agar sangre para hemólisis(47).-

Agar peptona con sangre de caballo (recogida asepticamente) al 5 %. El agar nutritivo contiene 2 % de agar, 1 % de peptona, 1% de extracto de carne y 0,5 % de ClNa.

Se procede como en la preparación del agar nutritivo y se agrega la sangre estéril antes de verter el medio en placas.

Caldo M^e Conkey (46).-

Fórmula :	Taurocolato de sodio	5 g.
	Lactosa	10 g.
	Peptona	20 g.
	ClNa	5 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Calentar en esterilizador a vapor durante dos horas y luego colocar en la heladera durante la noche. Filtrar en frío al día siguiente y ajustar el pH a 7,4 (rojo fenol); agregar 10 ml. de una solución acuosa de rojo-neutro al 1%, distribuir en cantidades de 5 ml. en tubos de ensayo provistos de tubitos de fermentación (Durham) y finalmente esterilizar en autoclave a 115°C. durante 15 minutos, o a 100°C. durante 30 minutos tres días sucesivos. Este medio deberá ser límpido, de color rojo clarete, libre de amarillo o anaranjado.

Medio Citrato (48).-

Fórmula :	Cloruro de sodio puro	5 g.
	Sulfato de magnesio	0,2 g.
	Fosfato monoamónico	1 g.
	Fosfato dipotásico	1 g.
	Agua destilada c.s.	1000 ml.

Disolver agitando, hasta obtener una solución límpida.

Agregar 2 g. de ácido cítrico. Llevar a pH 6,8 (azul de bromo timol) con solución de NaOH N. Distribuir en tubos y esterilizar en autoclave a 120°C. durante 10 minutos.

VII- BIBLIOGRAFIA

- 1) .- Mallmann W.L. - Streptococcus as an indicator of swimming Pool Pollution. Am J. Publ. Health 18, 771 (1928).-
- 2) .- Mallmann W.L. and Gelpi A.G., Jr. Chlorine Resistance of Colon Bacilli and Streptococci in a Swimming Pool. Michigan Exper. Sta Bull No 27 (1930).-
- 3) .- Todd Hewitt. Rev. O.S.N. No 140 pag. 174 (1951).-
- 4) .- Fleming J. Path. Bact. 35, 831 (1932).-
- 5) .- Perry G.A. y Petran E. A note on the use of doublepoured blood plates in the examination of throat and nose cultures for haemolytic Streptococci. Amer J. Clin. Path Tech Supp. 3, 70 (1939).-
- 6) .- Fleming A. y Young M.Y. The inhibitory action of potassium tellurite on coliform bacteria. J. Path Bact. 51, 29 (1940).-
- 7) .- Chapman G.H. The isolation of Streptococci from mixed cultures. J. Bact. 48, 113 (1944).-
- 8) .- Hartman G. Ein Beitrag zur Reinzucht von Mastitisstreptokokken aus verunreinigen. Material Milchw Forsch 18, 116 (1937).-
- 9) .- Snyder M.L. y Lichstein N.C. Sodium azida for the isolation of Streptococci. J. Bact. 42, 293 (1940).-
- 10) .- Lichstein N.C. The use of sodium azida for the isolation of Streptococci. J. Bact. 42, 293 (1941).-
- 11) .- Mallmann W.L. A New Yardstick for Measuring Sewage Pollution. Sew. Works J. 12, 875 (1940).-
- 12) .- Paker Allen R. The use of sodium azide and crystal violet in a

selective medium for Streptococci and Erysipelothrix rhusiopathiae. J. Bact. 46, 343 (1943).-

- 13) .- Hajna A.A. and Perry C.A. Comparative Study of Presumptive and Confirmative media for Streptococci. A. J.P.H. 33, 550 (1943).-
- 14) .- White J.C. y Sherman J.M. Occurrence of enterococci in milk. J. Bact. 48, 262 (1944).-
- 15) .- Newman R.M. Isolation of certain bacteria in cheese. Bull Dept. Agric. California. 33, 191 (1944).-
- 16) .- Pike R.M. The value of enrichment broth containing Te03K2 and crystal violet. J.Bact. 50, 211 (1945).-
- 17) .- Pike R.M. The isolation of hemolytic Streptococci from throats swabs, Experiments With sodium azide and crystal violet enrichment broth. Am J. Hyg. 41, 211 (1945).-
- 18) .- Winter C.E. y Sandholzer L.A. Isolation of esterococci from natural sources. Jour Bact. 51, 588 (1946).-
- 19) .- Leiguarda R.H. Peso O. A. y Kempny J.C. La azida sódica y el telurito de potasio en la investigación de enterococos. Rev. O.S.N. 121, 133 (1947).-
- 20) .- Ostrolenk M. y Hunter A.C. The distribution of enteric Streptococci. L.Bact. 51. 735 (1946).-
- 21) .- Rothe W.G. Personal communication to the Difco Laboratories (1948).-
- 22) .- Mallmann W.L. and Seligmann. A comparative study of media for the detection of streptococci in water and Sewage. Am.J.Pub. Health Assoc. 40, marzo (1950).-

FONDA

- 23) .- Litsky W. Mallman W.L. Ph.D.F.A.P.H.A. y Fifield C.W. A new medium for the detection of Enterococci in Water. American J. of Pub. H. vol 43, 873 (1953).-
- 24) .- Bernard Claudio Citado por H.J.Albaum J.Teperman y O Bodansky "in vivo" inactivation by cyanide of brain Cytochrome oxidase and its effect on glycolysis and on high energy phosphorous compound in brain.-
- 25).- Buernet F.M. The action of cyanides on Bacteria. J.Pathol Bacteriol XXX: 21, 1927).-
- 26) .- Braun H. Guggenheim K. Ueber Atmungstypen bei fakultativ aeroben pathogenen Bakterien Zentr, Bakteriologie, Parasitenk I, Orig. 127, 97 - 104 (1932).-
- 27) .- Braun H. Ueber das aerobe und anaerobe Wachstum der Bakterien unter der Einwirkung von Kaliumcyanid. 2 Mitteilung, Schwiez Z.allgem Pathol u Bakteriologie 1, 257 - 272 (1938) 2, 309 - 318 (1939).-
- 28) .- Buttiaux R. Distinction rapide entre Salmonella et bacilles paracoli du groupe Ballerup-Bethesda. Ann. Inst. Pasteur, 83,156 167 (1952).-
- 29) .- Moller V. Diagnostic use of the Braun CNK test within the Enterobacteriaceae, Acta Pathol Microbiol. Scand. 34, 115-126 (1954).-
- 30) .- María del Refugio Balcazar de Aztegui Bertha Rodriguez Lagunes y Consuelo Arteaga de Morphy. Método para el aislamiento selectivo de estreptococos de varias fuentes. Ciencia XIV (7-8) 143 144 (1954).-

F.C.F.N.A.

- 31) .- Cooper K.E. y Ramadan F.M. Studies in the Differentiation between Human and Animal Pollution by means of Faecal Streptococci *J. Gen. Microbiol* 12, 180-190 (1955).-
- 32) .- Andrewes F.W. y Horder T.J. A study of the estreptococci pathogenic to man. *Lancet*. 2-708 (1906).-
- 33) .- Dible J.H. J. *Path Bact.* 24 - 3 (1921).-
- 34) .- Lancefield R.C. T. *Exp. Med.* 57 - 571 (1937).-
- 35) .- Sherman J.M. *Bact. Rev.* 1 - 3 (1937).-
- 36) .- Shattock P.M.F. y Mattick A.T.R. The serological grouping of streptococci lactis (group N) and its relationship to *Streptococcus faecalis*. *J. Hyg. Camb.* 43, 173 (1943).-
- 37) .- Cooper K.E., Wood N., Elliot E., Caswell M. y Small W. Isolation of *Bact. para typhosum* B. from faeces. *J. Path Bact.* 54, 345 (1942).-
- 38) .- Cooper K.E. y Linton A.H. The value of thallium acetate for the isolation of gonococci and streptococci. *Mon Bull Minist Health. Lab. Serv.* 6, 204 (1947).-
- 39) .- Mc.Leod J.W., Anderson J.S. y Thomson Y.G. On the existence of two forms of diphtheria bacillus, B. diphtheriae gravis and *B. diphtheriae mitis*, and a new medium for their differentiation and for the bacteriological diagnosis of diphtheria. *J. Path Bact.* 34, 667 (1931).-
- 40) .- Ferramola R. Examen bacteriológico de aguas.
- 41) .- The bacteriological examination of water supplies. Ministry of Health, Londres Nº 71 pag. 53 (1939).-

FOIPA

- 42) .- Standard Methods of Water Analysis Pag. 200 8^o ed. 1936.
- 43) .- The bact. examination of water supplies N^o 71 pag. 51 Minis-
try of Health. Londres 1939.-
- 44) .- Ayers, Rupp. Differentiation of haemolytic streptococci from
human and bovine sources by hydrolysis of sodium hippurate
J. infect Dis 30, 388 (1922).-
- 45) .- Shattock, Hirsch A.A. A liquid buffered at pH 9,6 for the
differentiation of Str. faecalis from Str. lactis. J. Path
Bact. 59, 495 (1947).-
- 46) .- The bact. examination of water supplies N^o 71 pag. 52 (1939).
- 47) .- Shattock P.M.F. The streptococci of group D., the serological
grouping of str. bovis and observations of serologically re-
fractory group D. streins J. Gen Microbiol 3, 80 (1949).-
- 48) .- Koser. S.A. Differential test for colon am^ogenes group in
relation to sanitary quality of water. J. Infect, Dis. 35, 14
(1924).-

--- o o ---

Handwritten signature
de V