

Investigación del comportamiento de la estreptolisina O ante algunas sustancias y condiciones ambientales.*

DR. TILLMANN BRUNKER L.**

DR. ALVARO GUTIÉRREZ D.**

DR. OSCAR TERÁN D.**

INTRODUCCION

Es un hecho reconocido que la lisina O estreptocócica es relativamente inestable (1-2-3), como también que su título decae rápidamente durante los primeros días después de su obtención. El presente trabajo establece el efecto que una sustancia proteica (gelatina) y algunas condiciones ambientales tienen sobre la lisina.

MATERIALES

Para la producción de la lisina se utilizó *Streptococcus pyogenes*, cepa N° 10.289 de American Type Culture Collection(1).

Los cultivos se hicieron en el medio de Todd Hewitt modificado por Johnson (1), a partir de corazón fresco de buey según la siguiente fórmula:

Caldo base

Infusión de corazón, peso fresco	500 g
NaOH 1N	30 ml
Proteosa Peptona (Difco)(2)	20 g
Agua destilada, c.s.p.	1000 ml

El corazón se maceró durante 24 horas a 4°C en agua destilada, se calentó a 85°C por una hora, se enfrió a temperatura ambiente y luego se filtró, primero a través de tela y posteriormente por papel de filtro poroso en filtro de Buchner.

* Trabajo realizado en el Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica, parcialmente financiado por el Centro Internacional de Investigación y Adiestramiento Médico de la Universidad del Estado de Louisiana.

** Departamento de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

(1) American Type Culture Collection, Maryland, U.S.A.

(2) Difco Laboratories Inc., Detroit, Michigan, U.S.A.

Al extracto obtenido se le agregó Proteosa Peptona (Difco) a una concentración final de 20 g por litro y NaOH 0.1 N hasta un pH 6.8; se calentó nuevamente a 85°C por media hora, se enfrió y filtró. A lo anterior se agregó 40 ml por litro del siguiente buffer:

Glucosa	3 g
NaCl	2
NaHCO ₃	2
Na ₂ HPO ₄	2
Agua destilada	50 ml

El medio así preparado se autoclavó a 15 lbs/pulg² durante 15 minutos(3).

OBTENCION DE LA LISINA

Se prepararon erlenmeyers de 500 ml conteniendo cada uno 250 ml de medio de Todd-Hewitt.

El cultivo primario se obtuvo sembrando la cepa ATCC 10,289 en tubos conteniendo 5 ml del mismo medio, los que se incubaron a 37°C por 18 horas. Luego cada erlenmeyer se inoculó con el contenido de un tubo de cultivo primario, incubándose durante 24 horas a 37°C.

Comprobada la pureza del cultivo mediante tinción de Gram, se procedió a centrifugar a alta velocidad (34,000 G) por cinco minutos y luego se filtró el sobrenadante a través de membranas Millipore(4) de tipo AA para clarificar y HA para esterilizar el medio.

Como preservante se utilizó Mertiolate(5) en concentración final de 1:10,000. Para activar 10 ml de la lisina así obtenida se le agregan 2.5 ml de ácido tioglicólico en solución según la siguiente fórmula:

Acido Tioglicólico	0.3 ml
Agua Destilada	5.7 ml
Ajustar a pH 6 con NaOH al 60%	
Agua Destilada, c.s.p.	15 ml

TITULACION DE LA LISINA

Para titular la lisina se utilizó antilisisina estandarizada Hyland(6) la que, reconstituida según las indicaciones del fabricante y diluida 1:16.6 con "buffer de estreptolisina"(6) contiene 1 unidad de antilisisina por mililitro. El patrón de titulación fue el siguiente:

-
- (3) En la descripción original del medio, el buffer esterilizado por filtración se agrega al medio esterilizado en autoclave. Sin embargo comprobamos que al preparar el medio en nuestra forma, más sencilla, no se afecta significativamente el pH.
 (4) Millipore Filter Corp., Massachusetts, U.S.A.
 (5) Eli Lilly Co., Indianapolis, U.S.A.
 (6) Hyland Laboratories, Inc., Los Angeles, California, U.S.A.

	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml	ml
Lisina Reducida	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Buffer	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0	1.1	1.2	1.3	1.4	1.5
Antilisisina lu/ml	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Glóbulos al 5% ⁽⁷⁾	Incubar a 37°C por 15 minutos											
	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Dilución	1/1.8	1/2.0	1/2.2	1/2.4	1/2.6	1/2.8	1/3.0	1/3.2	1/3.4	1/3.6	1/3.8	1/4.0

Terminada la última incubación los tubos se centrifugan a 2000 rpm por 2 minutos. Se tomó como punto final la máxima dilución de la lisina que es capaz de producir alguna hemólisis bajo las condiciones descritas, y el inverso de esa dilución como el título.

TRABAJO EXPERIMENTAL

Por los métodos descritos se sembraron por triplicado erlenmeyers conteniendo medio de Todd y Hewitt.

A uno de los frascos con medio se adicionó gelatina en concentración final de 0.5% antes de inocularlo; a otro se adicionó la gelatina después de incubado, y al tercero se le utilizó como control. Durante 7 días se tomaron alicuantas de cada uno de los tres erlenmeyers, se redujeron con ácido tioglicólico y se titularon.

Al octavo día se procedió a reducir con ácido tioglicólico la mitad del volumen de cada una de las tres lisinas, manteniéndose la otra mitad para reducirse al momento del uso. Ambas porciones de las tres lisinas se titularon a intervalos por un total de 30 días.

Además, de cada una de las tres lisinas se tomaron también otras dos porciones que fueron almacenadas a 22°C y 37°C respectivamente con el fin de determinar el efecto de la temperatura sobre el producto.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

En el Cuadro N° 1 se anotan los resultados obtenidos en la titulación de estas lisinas. Como se observa, no hay diferencia significativa entre los títulos de las lisinas; también la caída del título fue similar en las tres durante todo el período de observación excepción de aquellas que fueron reducidas al 8° día. En estas últimas la caída del título fue mayor en las porciones "control" y N° 2, mientras que la porción N° 1 se comportó como lo hicieron aquellas que no fueron reducidas al 8° día.

Podemos concluir de lo anterior que la gelatina no tiene efecto protector sobre la lisina, salvo que se adicione antes de inocular el medio y se almacene la lisina en su forma reducida.

(7) Glóbulos humanos grupo ORho, lavados tres veces en solución salina fisiológica y suspendidos en buffer de estreptolisina.

Las lisinas mantenidas a temperaturas superiores a los 4°C (22 y 37°C) se inactivaron rápidamente, siendo la caída del título idéntica en ambas temperaturas de prueba (de 2.6 a 1.6 en 24 horas, y a menos de 1.4 en 48 horas).

Es importante señalar que nosotros, a diferencia de otros autores, no pudimos observar una caída notoria del título de las lisinas durante la primera semana de almacenamiento a 4°C.

R E S U M E N

Se produjo lisina O estreptocócica en medio de Todd y Hewitt. A algunas porciones del medio de cultivo se adicionó gelatina antes y a otras después de la incubación.

Se concluye que la gelatina no tiene efecto protector sobre la lisina, salvo que se adicione antes de inocular el medio y se almacene la lisina en su forma reducida.

Se estableció también que, contrario a lo citado en la literatura, en nuestro caso el título de la lisina no decayó significativamente durante la primera semana de almacenamiento a 4°C.

Temperaturas de 22°C y 27°C desnaturalizan la lisina en menos de 48 horas.

S U M M A R Y

Streptolysin O was produced employing Todd & Hewitt medium. Gelatin was added to the growth medium in some cases before and in others after the 37°C incubation.

It was shown that gelatin does not have a protective effect on streptolysin O unless it is added before inoculation of the medium and the lysin is reduced in bulk before storage.

It was also established that, contrary to what has been reported, in our case the titer of the lysin did not drop significantly during the first week of storage at 4°C.

Temperatures of 22° and 27°C were shown to denature this lysin in less than 48 hours.

CUADRO N° 1

EFFECTO DE GELATINA Y ETAPA DE REDUCCION SOBRE LA ESTABILIDAD DE LA ESTREPTOLISINA O*

CONTROL: Lisina sin gelatina.
 N° 1 : Lisina preparada en medio con gelatina.
 N° 2 : Lisina adicionada de gelatina después de preparada.
 Red. : Reducción de toda la porción.

* Las cifras expresan unidades de estreptolisina por mililitro.

CUADRO N° 1

Día	1	2	3	4	5	6	7	8	13	16	20	30
Control	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.6	2.6	—	2.4	2.4	2.2	2.2
								Red	2.6	2.2	1.6	—
N° 1	2.6	2.6	2.8	2.8	2.8	2.8	2.6	—	2.2	2.2	2.2	2.0
								Red	2.4	2.2	2.2	2.0
N° 2	3.0	2.8	2.8	2.8	2.8	2.6	2.6	—	2.2	2.2	2.2	2.0
								Red	2.6	2.2	1.6	—

BIBLIOGRAFIA

- 1.—GERALD D., JOHNSON.
The determination of streptolysin. *Jour. Clin. Path.*, Vol. 8, N° 4, p. 296, 1955.
- 2.—JAWETZ, E.; MELNICK, J. L. Y ADELBERG, E. A.
Manual de microbiología médica. p. 153, 2ª ed. 1966. El Manual Moderno, S. A. México 11, D. F., México.
- 3.—KRUIF, P. H. DE AND IRELAND, P. M.
Studies on streptolysin. *J. Infect. Dis.*, 26, 285, 1920.