

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



TESIS DOCTORAL

Contribución al estudio de los cocos anaerobios Gram (+)

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Ana María Berzosa Aguilar

DIRECTOR:

José Bravo Oliva

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONTRIBUCION AL ESTUDIO
DE LOS COCOS ANAEROBIOS
GRAM (+).

Ana M^a Berzosa Aguilar

Madrid, 1977

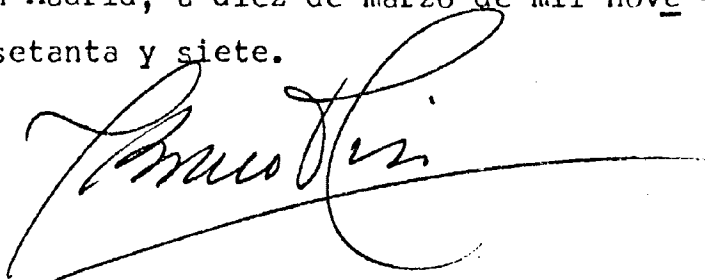
CATEDRATICO: D. JOSE BRAVO OLIVA

M A D R I D

D. JOSE BRAVO OLIVA, CATEDRATICO DE MICROBIOLOGIA Y PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD - COMPLUTENSE DE MADRID.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS COCOS ANAEROBIOS GRAM (+)" ha sido realizado bajo mi dirección por Dña Ana María Berzosa Aguilar, como trabajo de tesis para la obtención del Grado de Doctor en Biología por la Facultad de Biológicas de la Universidad - Complutense.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a diez de marzo de mil novecientos setenta y siete.



BIBLIOTECA UCM



530531415X

DER
CON

FACULTAD DE BIOLÓGICAS

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS
COCOS ANAEROBIOS GRAM (+).



R.- 20.347

Tesis realizada bajo la dirección
del Prof. Dr. D. José Bravo Oliva
y que para aspirar al grado de -
Doctor en Biología presenta:

Ana Ma Berzosa Aguilar.

Madrid, 1977

Antes de comenzar la exposición del presente trabajo deseo expresar mi agradecimiento,

Al Prof. Dr. D. José Bravo Oliva, por brindarse amablemente a dirigir esta tesis, y por sus constantes muestras de interés que han supuesto para mí un fuerte estímulo, tanto moral como científico.

Al Dr. J.J. Rodríguez Otero, quien me ha introducido en el campo de las Bacterias anaerobias y que en todo momento me ha ayudado en la realización de este trabajo.

Esta tesis tampoco hubiera sido posible sin la desinteresada ayuda de todo el personal médico y auxiliar de la Sección de Bacteriología del Laboratorio Central del Hospital Clínico de San Carlos de Madrid, especialmente, al Dr. D. Ricardo Valor Perea, Jefe del Servicio del Laboratorio de dicho Hospital por sus sujerencias y atenciones.

Finalmente, no quiero olvidar a mi padre Cesáreo Berzosa y a mi marido Emilio Castiella que tanto me han ayudado en la realización de esta tesis.

I N D I C E

I.- INTRODUCCION

- I.1.- Consideraciones generales.
- I.2.- Antecedentes históricos.
- I.3.- Evolución de las clasificaciones de los -
cocos anaerobios Gram (+).

II.- MATERIAL Y METODOS

- II.1.- Procedencia de las muestras.
- II.2.- Toma y transporte de muestras.
- II.3.- Métodos para la obtención de anaerobio -
sis.
- II.4.- Medios de aislamiento y enriquecimiento.
- II.5.- Identificación.
 - II.5.1.- Métodos convencionales.
 - II.5.2.- Métodos standarizados "Sistema -
API 20 ANAEROBES".
- II.6.- Estudio de la sensibilidad a los antibió-
ticos.

III.- RESULTADOS

III.1.- Tablas de los resultados por métodos con
vencionales.

III.1.- Tablas de los resultados por el "Sistema -
API 20 ANAEROBES".

III.2.- Comparación de los dos métodos de identi-
ficación utilizados.

III.3.- Relación de las cepas identificadas y su -
origen.

III.4.- Sensibilidad de las cepas aisladas a los -
antibióticos.

IV.- DISCUSION

V.- CONCLUSIONES

VI.- BIBLIOGRAFIA

I.-INTRODUCCION

I.1.- CONSIDERACIONES GENERALES

Existe una tendencia generalizada a creer - que las primeras formas de vida en la tierra fueron - las anaerobias, ya que la atmósfera primitiva estaba - probablemente formada por una mezcla de amonio, meta - no, dióxido de carbono e hidrógeno. A pesar de ello , la existencia de las bacterias anaerobias no se cono - ce hasta 1891, año en que Pasteur (1) encontró un - anaerobio (*Clostridium butyricum*) al realizar sus tra - bajos de fermentación.

Aunque Veillón (2) había descrito las bacte - rias anaerobias no toxigénicas como contribuyentes de la flora que lleva su nombre, hasta mediados del pre - sente siglo y debido principalmente a la dificultad - que presenta el aislamiento de muchas de ellas, no se ha comenzado a darles la importancia que verdaderamen - te tienen, siendo quizás una excepción el Género *Clos - tidium*, ya que durante las dos últimas guerras mundia - les originó serias infecciones entre los combatientes, dando lugar a cuadros específicos, por lo que los - anaerobios esporulados son los más conocidos.

Las bacterias anaerobias no esporuladas se encuentran repartidas por todo el cuerpo, principalmente en la superficie de membranas mucosas desde donde pueden invadir tejidos y originar cambios patológicos.

En los últimos años se ha prestado una gran atención a las infecciones producidas por Bacilos Gram (-) anaerobios estrictos y sobre todo a las producidas por los bacteroides del grupo "fragilis", que en principio son responsables con una mayor frecuencia de infecciones humanas y a la vez los que tienen mayor tendencia a adquirir resistencias a los antibióticos.

Por nuestra parte, hemos creído interesante ocuparnos de los cocos Gram (+) anaerobios porque han sido quizás menos estudiados, a pesar de que con frecuencia son también responsables de infecciones graves y además, hemos intentado prestar una atención preferente en nuestro trabajo a los aspectos taxonómicos y bioquímicos, considerando las dificultades de cultivo e identificación que son características en

en estos gérmenes.

El objeto de esta tesis ha sido pues:

1. Comparación de los resultados que ofrecen los métodos convencionales y las modernas técnicas standarizadas para la identificación de las especies de cocos Gram (+) anaerobios estrictos.
2. Valoración de la presencia de diferentes especies en infecciones clínicas humanas.
3. Estudio de la sensibilidad a los antibióticos.

I.2.- ANTECEDENTES HISTORICOS

El primer coco anaerobio estricto fué aislado de procesos patológicos de la boca y tracto urinario por Veillón (3). Este organismo fué llamado Micrococcus foetidus por el mal olor de sus cultivos y pudiera ser el mismo que había encontrado Rosembach (4) en un diente careado; es el Peptostreptococcus anaerobius del Bergey's Manual (8ª edición).

Posteriormente Krönig (5), y Meng y Krönig (6), describieron el aislamiento de cocos anaerobios-estrictos, iguales morfológicamente al Streptococcus pyogenes, y obtenidos de la vagina tanto en embarazo-normal como en caso de sepsis puerperal.

En 1898, Veillón y Zuber (2) estudiaron procesos gangrenosos de pulmón y apendicitis. En los apéndices gangrenosos y perforados cuyo pús tenía olor fétido muy marcado, se encontraron estreptococos anaerobios junto con colibacilos, estos últimos en proporción muy pequeña.

Lew Kowicz (7) encontró Veillonella alcalicens en la boca de nodrizas, siendo así el primero en

encontrar cocos Gram negativos anaerobios.

Natring (8) confirmó los anteriores descu -
brimientos y propuso que todos los cocos anaerobios -
fuesen incluidos dentro de la especie Streptococcus -
anaerobius.

Schottmüller (9), estudió la presencia de -
cocos en la vagina normal así como su asociación con
la infección puerperal.

Holman y col. (10) estudiaron la flora de -
la boca del hombre y de los animales encontrando co -
cos anaerobios Gram negativos. Dos años más tarde, -
Hall y col. (11) los encontraron en la saliva humana.

Schwartz y Dieckman (12), Collebrook (13), -
Schawartz y Brown (14), aislaron estreptococos anaero -
bios en casos de bacteriemia por fiebre puerperal.

Levinthal (15) estudió la flora anaerobia -
de la mucosa de las fauces, encontrando un coco anaer -
obio (Streptococcus parvulus) que cultivó gracias a
un fenómeno de simbiosis con una estreptotricaceae.

Hall (16), aisló un coco anaerobio de la orina de una mujer de edad avanzada que producía un pigmento negro identificándolo como *Micrococcus niger*.

White (17), estudió la flora vaginal de 50 - mujeres embarazadas encontrando cocos anaerobios en 18 casos durante los primeros meses de embarazo, y 15 en el último mes.

Lemierre (18), encontró cocos anaerobios asocciados a *Bacillus fundiliformes*, como causantes de infecciones en garganta, oído y útero.

Mac Lennan (19), aisló estreptococos anaerobios en heridas de guerra que no contenían *Clostridium*.

Hite, Hesseltine y Goldstein (20), aislaron *Micrococcus anaerobius* a partir de muestras de vagina y útero.

Foubert y Dougel (21), consiguieron 52 cultivos, de los cuales 36 procedían de piel humana, útero y amígdalas. Todos eran anaerobios estrictos, sin tendencia a serlo facultativos, pero eran catalasa (+). Entre

estos anaerobios encontraron Veillonella, apareciendo Gram (+) en cultivos jóvenes y negativos en cultivos de 12 horas. Evans y col. (22), encontraron cocos anaerobios en la piel.

Digeon y Raynaud (23), encontraron Micrococcus niger en las heces de niñeras, casi tan frecuentemente como el Actinomyces difidus.

Hare, Wildy y Billet (24) estudiaron, 99 cultivos de origen muy variado: 71 de vagina humana, 23 de tracto respiratorio, etc., todos ellos de material patológico. El origen de los otros 5 no está especificado.

Un año más tarde, dos de los anteriores autores Hare y Wildy (25), estudiaron los efectos de algunos ácidos grasos sobre el crecimiento, metabolismo y morfología de los mismos cocos anaerobios, y comprobaron que el tween 80 estimulaba el crecimiento de estos micro-organismos. En presencia de ciertos ácidos, como el oleico, se podía modificar el crecimiento, la capacidad para atacar los hidratos de carbono y los ácidos orgánicos, la formación de gas y la morfología

de los cocos del grupo III y IV, pero no se modificaba el metabolismo ni la morfología de cepas de los grupos I, II, V, VI (clasificación de los cocos anaerobios de Hare). (pág.28).

Thomas y Hare (26), encontraron cocos anaerobios en muestras de distintos orígenes, tanto de personas sanas como de infecciones clínicas. En las personas sanas las muestras procedían de nariz, garganta, heces, vagina, piel, encías y oído. Las muestras de infecciones clínicas procedían de casos de fiebre puerperal e infecciones del tracto respiratorio. Llegaron a la conclusión de que los cocos anaerobios eran más frecuentes en las superficies mucosas y en la piel de las personas sanas que en las muestras patológicas.

Morris (27), encontró cocos anaerobios en la boca y Richardson y Jones cuatro años más tarde en la saliva.

Lakey y Fitzgerald en 1955 centran su estudio en el Género Veillonella, intentando encontrar algún antibiótico que incorporado al medio de aislamiento le hiciera lo más selectivo posible, siendo este antibióti

co la estreptomicina en una concentración de 5 microgramos por mililitro. Rogosa (28) no está de acuerdo en que sea la estreptomicina el antibiótico más selectivo para el aislamiento de Veillonella, al comprobar que actúa como inhibidor de las cepas jóvenes por lo que propone emplear la Vancomicina (7,5 μ gr/ml.) en el medio de aislamiento.

Stokes (29), en seis años de experiencia aisló 496 organismos anaerobios y encontró aproximadamente 200 cepas de cocos Gram (+) en cultivo mezclado y 100 en cultivo puro, siendo el Género Peptococcus el más frecuentemente aislado en abscesos de corazón e infecciones de los dedos.

Prévot, Cadore y Thouvenot (30) aislaron cocos anaerobios a partir de la vagina de mujeres sanas y de las heces de niñeras.

Wills y Reece (31) aislaron estreptococos anaerobios asociados a Bacteroides.

Rogosa (32,33,34,35) estudió la ecología, reacciones bioquímicas, requerimientos nutricionales ,

serología y cultivos del Género Veillonella, estableciendo que no requieren riboflavina ni ácido fólico - para crecer; que la niacina y pantotenato cálcico - eran unas veces estimulantes y otras necesario para - el crecimiento.

Finegold, Miller y Sutter en 1968 encontraron 81 infecciones debidas a cocos anaerobios. Estas infecciones eran: Bacteriemia, abscesos del cerebro , neumonia necrotizante, abscesos intraabdominales, peritonitis, heridas infectadas y osteomielitis, siendo el Género Peptococcus el más frecuentemente aislado.

Rotheram (36), estudió el papel de varias - especies bacterianas en el aborto séptico. De las 56 pacientes en las que se practicó hemocultivo, se de - mostró bacteriemia en 34, obteniéndose 34 anaerobios- estrictos, de los que 18 eran cocos.

Martín (37) del Laboratorio de Microbiolog - gía de la Clínica Mayo, aisló durante 1970, de 10191- muestras 5029 bacterias anaerobias, de las cuales 842 (17 %) eran Peptococcus y 427 (8 %) eran Peptostreptoc - coccus. Las especies de estos cocos encontrados fuen -

ron:

Peptococcus

P. prevotii.

P. asacharolyticus.

Peptostreptococcus

Ps. magnus.

I.3.- EVOLUCION DE LAS CLASIFICACIONES DE COCOS ANAEROBIOS GRAM (+).

La clasificación de las bacterias evoluciona con el tiempo, dependiendo de los conocimientos científicos que sobre las mismas se tiene. Así pues hay revisiones periódicas de dichas clasificaciones, no existiendo ninguna que haya alcanzado una aceptación universal.

Las distintas clasificaciones existentes de las bacterias anaerobias, difieren a veces entre sí y su comparación es más complicada que en el caso de las bacterias aerobias estrictas o facultativas.

El primer intento de clasificación lo realizó Prévot (38) en 1925 al dividir los cocos hasta entonces encontrados en tres grupos, basándose en caracteres morfológicos y fisiológicos.

CLASIFICACION DE PREVOT (1925)(38).

Grupo I: Estreptococos de olor fétido, productores de gas y gangrenógenos.

Micrococcus foetidus.

Streptococcus anaerobius.

Streptococcus putridus.

Grupo II: Streptococos no productores de olor fétido ni de gas, pero piógenos.

Streptococcus micros.

Streptococcus intermedius.

Grupo III: Streptococo anaerobio, que puede llegar a ser facultativo, sin olor fétido ni producción de gas, también piógeno.

Streptococcus evolutus.

En 1948 Prévot (39) modifica esta clasificación, siendo uno de los caracteres fundamentales de la nueva clasificación la tinción de Gram. Crea así el Género Veillonella que hasta entonces era considerado como estafilococo anaerobio, pero además de este género forma la clasificación siguiente:

Neisseria

Micrococcus

Diplococcus

Streptococcus

Gaffkya

Sarcina

Cada uno de estos géneros incluye el menos una especie anaerobia.

Esta clasificación es ampliada por Prévot - en 1957 (40) sirviéndole de base para ello los caracteres morfológicos y la tinción de Gram. Establece - dos familias, tres tribus, diez géneros, cuarenta y - una especies y ocho variedades.

CLASIFICACION DE PREVOT (1957) (40)

Familia I: NEISSERIACEAS.- Cocos Gram (-)

Gen. I. Neisseria.- Cocos en parejas, con-
lados continuos aplanados.

Gen.II. Veillonella.- Cocos en masas irre-
gulares, muy pequños.

Familia II: MICROCOCCACEAE.- Cocos Gram (+)

Tribu I. Streptococceae: Cocos en parejas
o en cadenas cortas.

Gen.I. Diplococcus.- Cocos en parejas, raramente en cadenas - cortas.

Gen.II. Streptococcus.- Cocos en cadenas, raramente en cadenas cortas.

Gen.III. Ruminococcus.- Cocos en cadenas.

Tribu II. Staphylococceae: Cocos Gram (+), en masas planas.

Gen.I. Gaffkya.- Cocos en tétradas.

Gen.II. Staphylococcus.- Cocos en masas - irregulares planas.

Tribu III. Micrococceae.- Cocos en masas regulares e irregulares.

Gen.I. Sarcina.- Cocos en paquetes cuboidales de ocho unidades.

Gen.II. Micrococcus.- Cocos en masas irregulares.

Gen.III. Methanococcus.- Cocos en masas, - Gram variable.

El Bergey's Manual (7ª Ed. 1957) (41) adoptó la clasificación de Prévot, pero con algunos cam - bios en la nomenclatura, y con la adición de las tres especies descritas por Foubert y Douglas (21). Esta - clasificación es menos complicada que la de Prevot. - Comprende tres familias, cinco géneros, treinta y - seis especies y seis variedades.

CLASIFICACION DEL BERGEY'S MANUAL (7ª Ed. 1957)(41)

Familia I: MICROCOCCACEAE.- Cocos Gram (+), solos, en parejas, tétradas, paquetes, cadenas y masas irre - gulares.

Gen.I. Sarcina.- Cocos en paquetes.

Gen.II. Methanococcus.- No están en paquetes, producen meta - no.

Gen.III. Peptococcus.- No están en paquetes, no producen metano.

Familia II: Neisseriaceae.- Cocos Gram (-) en parejas y masas.

Gen.I. Veillonella.- Cocos en parejas, ma
sas y cadenas.

Familia III. LACTOBACILLACEAE.- Bacilos y cocos Gram
(+).

Tribu I. Streptococceae: Cocos sólo, en parejas
y cadenas raramente en-
tétradas.

Gen.I. Peptostreptococcus.- Cocos Gram (+)
en parejas y
cadenas.

De este modo, al criterio de clasificación-
de Prévot se le dió carácter oficial, con todos sus -
aciertos y fallos. Así por ejemplo, caracteres que de
bían ser secundarios, como el diámetro del coco y su -
disposición en el campo del microscopio, se considera-
ban como caracteres primarios, lo cual inducía a error,
pues estos caracteres están sometidos a variaciones -
según el plano de división y el polimorfismo de la ce-
pa.

Pero el Bergey's Manual (7ª Ed) (41) no siempre
sigue a Prévot (40). Así las reacciones de fermen-

tación de *Diplococcus constellatus* y *Staphylococcus* - aerógenos descritas por el Manual, son bastante diferentes a las que da Prévot, debido quizás a que estos organismos poseen ciertos requerimientos metabólicos - que al no cumplirse en todos los medios hace que los resultados difieran de un laboratorio a otro.

Para evitar esta confusión, Hare y col.(24), Hare (25), y Thomas y Hare (26) proponen un nuevo es - quema para la clasificación de cocos anaerobios basándose en las siguientes pruebas:

1) Pruebas primarias:

- a) Fermentación de azúcares: Glucosa, sacarosa, fructosa y galactosa.
- b) Fermentación de sales orgánicas de ácidos grasos: Pirúvico, málico, tartárico, láctico.
- c) Producción de gas.

II) Pruebas accesorias:

- a) Capacidad para formar cadenas.
- b) Sensibilidad de los antibióticos y sulfamidas.

c) Localización en el cuerpo humano.

CLASIFICACION DE THOMAS Y HARE (1954) (26).

GRUPO	CONTROL	GLUCOSA	SACAROSA	MALTOSA	FRUCTOSA	GALACTOSA	PIRUVATO	MALATO	CITRATO	TARTRATO	LACTATO	
I	-	AG	-	AG	AG	-	G	-	-	-	-	Cadenas
II	-	-	-	-	-	-	G	-	G	G	-	Racimos
III	-	AG	AG	AG	AG	AG ⁺	G	-	-	-	-	Racimos
IV	-	-	-	-	A	-	G ₋ ⁺	-	-	-	-	Racimos
V	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	Racimos
VIa	-	A	A	A	A	A	-	-	-	-	-	Cadenas
VIb	-	A	A	A	A	A ⁺	-	-	-	-	-	Racimos
VII	-	A	-	-	A	-	-	-	-	-	-	Racimos y cadenas
VIII	-	AG	-	-	AG	-	G	-	-	-	-	Masas, racimos
IX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Masas, racimos

TABLA I.: A=ácido; G=gas, en medio conteniendo 0,01 % oleato sódico 0,01 %, tioglicolato sódico y 1 % de la sustancia.

Hare (41) amplia el número de sustancias en las pruebas de fermentación, para los subgrupos VIa y VIb, siendo las sustancias utilizadas: celobiosa, trehalosa, dextrina, coniferina, esculina, lactosa y manosa y comprueba que dentro de cada subgrupo no todas las cepas fermentaban los mismos azúcares. Así 27- cepas del subgrupo VIa fermentaban todos los azúcares menos la esculina y lactosa. Nueve sólo fermentaban - la esculina y ocho sólo la lactosa.

Pero esta clasificación de Thomas y Hare - (27) no ha sido muy utilizada a pesar de ser bastante buena, debido quizás a la no utilización de géneros y especies, que son sustituidos por grupos.

El Bergey's Manual (8ª Ed. 1974) (42) divide los cocos anaerobios en dos familias diferenciados principalmente por la tinción de Gram. Las diferenen - cias entre los géneros se basan en la morfología, fermentación de azúcares y posibilidad de utilizar los - aminoácidos y peptonas como única fuente de energía.

Familia I: VEILLONELLACEAE.- Cocos Gram (-).

Gen.I. Veillonella: Cocos pequeños, en pa
rejas, masas y cor-
tas cadenas. No fer-
mentan los azúcares-
y no pueden vivir só-
lo con aminoácidos y
peptonas.

V. parvula.

V. alcalescens.

Gen.II. Acidaminococcus: Diplococos. No -
fermentan los -
hidratos de car-
bono, pero los -
aminoácidos pue-
den ser su única
fuente de ener-
gía.

A. Fermentans.

Gen.III. Megasphaera: Cocos grandes fermen-
tan los azúcares.

Familia II: PEPTOCOCCACEAE.- Cocos Gram (+), con parejas, tétradas y masas irregulares, a veces en paquetes cúbicos tridimensionales.

Gen.I. Peptococcus: En parejas, tétradas y masas irregulares, pero nunca en paquetes cúbicos tridimensionales. Pueden utilizar los productos de la descomposición de las proteínas como única fuente de energía, no forman cadenas.

P. niger.

P. asacharolyticus.

P. aerógenes.

P. activus.

P. constellatus.

P. anaerobius

teínas como única-
fuente de energía.

R. favefaciens.

R. albus.

Gen.IV. Sarcina: En paquetes cúbicos. No -
utilizan ni las peptonas-
ni los aminoácidos como -
fuente de energía. Pueden
crecer a pH 2-2,5.

S. ventriculi.

S. maxima.

Descripción de las distintas especies de Pep-
tococcus y Peptostreptococcus del Bergey's Manual. 8ª
Ed. (42).

PEPTOCOCCUS NIGER: (44,46).

Esferas pequeñas de 0,6 μ m de diámetro aproxi-
madamente, se presentan en masas irregulares, a veces-
en pares, pero no en cadenas.

El crecimiento es lento en todos los medios -
de agar; se requieren de dos a cuatro días para que -

Gen. II. Peptostreptococcus: Parejas y cade-
nas cortas pero
nunca en paque-
tes cúbicos. Pue
den utilizar -
los productos -
de la descompo-
sición de las -
proteínas como
única fuente -
de energía.

Ps. anaerobius.

Ps. productus.

Ps. lanceolatus.

Ps. micros.

Ps. parvulus.

Gen. III. Ruminococcus: Puede presentarse -
aislado, en pareje -
jas, cadenas cortas
o largas pero nunca
en paquetes cúbicos.
No utilizan los produ
ctos de la descompo
sición de las produ

aparezcan las colonias a 37° C, y aproximadamente si
te días a 25-30° C.

Son incoloras inicialmente en agar profundo, pero se vuelven de marrón o negro en 4-5 días con pro
ducción de pigmento no difusible; a veces aparecen pe
queñas burbujas de gas.

En agar-sangre, las colonias son pequeñas al principio, como perlas negras, alcanzando un diámetro de 0,5 mm, redondas, lisas y brillantes; no son hemo-
líticas.

Sobre suero de sangre coagulada, el crecimen
to es más lento requiriendo ocho días para la aparición de pequeñas colonias marrones. En medio de gelatina se aprecia un sedimento que se vuelve gradualmente negro - al cabo de cinco o más días. En medio de cerebro el cre
cimiento también es lento, con producción de gas unifor
memente después de seis días. No hay cambios en leche. El líquido ascítico no aumenta el crecimiento en infu -
siones de agar con 2 % de peptona. En caldo el creci -
miento es también lento, siendo visible a los 2-5 días.

Generalmente no fermenta hidratos de carbono y polioles. No licuan la gelatina ni el suero de san - gre coagulado. Produce SH₂ en medio de cerebro.

PEPTOCOCCUS ASACHAROLYTICUS: (42, 45, 46).

Esferas de diámetro visible entre 0,6-1,5 - μm dentro de una misma o de diferentes cepas, y aparecen solos, en pares, tétradas, masas irregulares y cadenas cortas.

Las colonias son circulares generalmente, de 0,5-2,0 mm de diámetro, lisas, enteras, poco convexas , opacas o traslúcidas; en agar profundo tienden a ser - lenticulares.

En caldo desarrollan una turbidez homogénea. El crecimiento no se aumenta por glucosa, sangre o suero. No fermenta la albúmina de huevo, suero y caseina . No cambia la leche. Los ácidos grasos no estimulan la - fermentación de hidratos de carbono. Se produce gas a - partir del piruvato, citrato o tartrato.

Aislado del intestino grueso, cavidad bucal,

pleura, útero y vagina. Se puede incluir probablemente en el Grupo II de Hare (1952) (24).

PEPTOCOCCUS AEROGENES: (42,47,48).

Las características generales del cultivo, - el metabolismo de aminoácidos y el contenido GTC del-DNA (36 moles %) son indistinguibles del *P. asacharolyticus*. Sin embargo difieren en la fermentación de - ciertos hidratos de carbono.

Pequeñas cantidades de glucosa y fructosa - pueden ser fermentadas en medios sin ácidos grasos suplementarios, pero la adicción de oleato sódico u - otros ácidos activa la fermentación de glucosa y fructosa con producción de ácidos y gas (Wildy y Hare) (25), Hare (41). La fermentación de sacarosa, maltosa o galactosa es variable.

Aislados de casos de fiebre puerperal, tracto genital femenino y nariz.

Parece corresponder con el grupo VIII de Hare (1967) (41).

PEPTOCOCCUS ACTIVUS: (42,49,24).

Esferas de 0,8- 1,0 μ m de diámetro. Las colonias pueden alcanzar 4 mm en cuatro días, la superficie varía de lisa a rugosa, son blanco-parduzcas, li-geramente amarillentas, crema o marrón claro.

En caldo infusión, el crecimiento es muy turbio con abundante gas dentro de las 48-72 horas.

Se produce ácido y gas a partir de glucosa,-fructosa, manosa, maltosa, sacarosa y generalmente galactosa. Fermenta débilmente la lactosa y L-arabinosa; no fermenta rafinosa, almidón, inulina, salicina, gli-cerol o manitol.

Digiere parcialmente el suero coagulado, albúmina de huevo, fibrina, cerebro y caseina con variable ennegrecimiento. La leche la fermenta parcialmente. Reduce los nitratos.

Aislados de septicemias pauperales y el tracto genital femenino.

Se puede corresponder con el Grupo III de -
Hare (24).

PEPTOCOCCUS CONSTELLATUS (42,50):

Esferas de 0,5-0,6 μ m de diámetro, aparecen -
en pares, tétrados y raramente en cadenas cortas, es-
feras de 0,8-1 μ m de diámetro dispuestas en masas -
(Hare) (41), nunca en racimos (Prevot)(50).

Las colonias lenticulares en agar profundo -
son biconvexas, delgadas, opacas, amarillentas y pri-
mero muy pequeñas, obteniendo el tamaño máximo de -
0,5-1,5 mm en cinco días.

Crecen muy mal en medios sin hidratos de carbo
bono. No produce gas.

Fermenta la glucosa, fructosa, galactosa, mal
tosa, sacarosa y manosa; no fermenta la lactosa o es
variable. No fermenta tampoco la celobiosa, dextrina,
coniferina y esculina. La indicación original (Prevot
1924) (50); de una fermentación positiva de arabinosa
y una negativa de trehalosa son erróneas, las modernas

técnicas muestran que la arabinosa no es fermentada - y si lo es la trehalosa. No ataca a proteínas coaguladas, no licua la gelatina, no produce indol.

Se ha aislado de pleuresia purulenta, nariz, garganta, encías, y es poco frecuente en piel y vagina.

Se puede corresponder con el Grupo VIb de - Hare (41).

PEPTOCOCCUS ANAEROBIUS (42,51,52,53,54,55):

Esferas de 0,6-1,0 μ m de diámetro, aparecen solos, en pares, tétradas y masas. Las colonias en agar son 0,5-3,0 mm de diámetro, circulares, superficie lisa a rugosa, enteras, poco convexas, de grisáceas a marrón claro. En agar profundo las colonias son lenticulares.

No fermenta los hidratos de carbono o lo hace débilmente. No licua la gelatina y albúmina de huevo . Se creyó que era catalasa positiva, pero en el presente la reacción es débil. No reduce los nitratos ni produ

duce indol. Produce SH_2 . No cambia la leche.

Se puede incluir en el Grupo IX de Hare (41).

PEPTOSTREPTOCOCCUS ANAEROBIUS (44,57,5,58,53,59):

Coco de 0,8 μm de diámetro medio, se presenta en cadenas. Las colonias son traslúcidas, cúpulas gris perla uniforme con borde completo. Diámetro principal alrededor de 1,5-2,0 mm en cuatro días. En agar profundo las colonias son lenticulares.

Produce gas en todos los medios. Olor **fétido** en todos los medios.

No ataca las proteínas coaguladas. Fibrina fresca y órganos frescos aparecen parcialmente desintegrados y envejecidos por el sulfhídrico producido. El sulfhídrico también se produce en medios sin tejidos frescos si están presentes tioglicolato (0,1 %) o cisteína (0,1 %) o tiosulfato sódico (1 %) o flor de azufre (1%). No licúa la gelatina, no cambia la leche y no produce indol.

Fermenta débilmente la fructosa, glucosa y - maltosa (Tabla II). La fermentación de hidratos de - carbono se estimula por el compuesto de azufre citado - pero no por ácidos grasos.

Puede ser patógeno.

Aislado en casos de gangrena putrefacta, heridas de guerra, osteomielitis, secreciones genitales - normales o patológicas, apendicitis, tracto intestinal, pleuresia y boca.

PEPTOSTREPTOCOCCUS PRODUCTUS (60):

Esferas de 0,7-1,2 μ m de diámetro, se presenta en cadenas.

Además de los hidratos de carbono de la Tabla II, fermenta dando ácido y gas: amigdalina, celobiosa, manosa, melizitosa, melibiosa, pectina, raffiosa, ribosa, sorbitol, trehalosa. Da fermentación débil o variable con: arabinosa, dextrina, dulcitol, esculina (hidrolizada), glicerol, inositol, inulina, manitol, salicina, sorbosa y almidón.

Aislado de: Casos subcutáneos de gangrena pulmonar, tracto intestinal, cerebro, abscesos pélvicos, orina y sangre.

PEPTOSTREPTOCOCCUS LANCEOLATUS (61,53):

Células ovales de 1,2-1,4 μm de diámetro, con extremos apuntados, se presentan en cadenas cortas en cultivos y como pares en exudados. Las características generales se presentan en la Tabla II.

Aislados de: diarrea pútrida, infección dental, vulvovaginitis y abscesos artríticos.

PEPTOSTREPTOCOCCUS MICROS (7,53):

Esferas pequeñas de 0,3-0,5 μm de diámetro, en cadenas largas o en pares.

Fueron descritas por Prevot (1933) como que fermentaban glucosa, fructosa, galactosa, sacarosa y maltosa con producción de ácidos consistentes en propiónico, fórmico y láctico. No formaba gas. Moore y Holdeman (comunicación personal) estudiaron 22 cepas,

incluyendo 19 cepas de las originales de Prevot y no confirman estos datos. Sus cepas no fermentan ningún azúcar y no forman ácido propiónico pero se forma bastante ácido láctico que es el mayor producto (50-90 %) con acetato de succinato como productos significativos, y formato en menores cantidades. Las ca - características generales se representan en la Tabla - II.

Aislados de pleuresía purulenta, útero sepsis puerperal, abscesos cerebrales y dentales.

PEPTOSTREPTOCOCCUS PARVULUS (62,63,15):

Pequeñas esferas de 0,3-0,4 μ m de diámetro. Se presentan en cadenas cortas y ocasionalmente en pares. Las colonias pueden llegar a ser negras. Fermenta débilmente los hidratos de carbono (Tabla II) - y puede ser debido al escaso crecimiento.

Aislados una vez del tracto respiratorio y otra de la boca.

CARACTERISTICAS DE LAS ESPECIES DE LOS
 GENEROS PEPTOSTREPTOCOCCUS (TABLA II)

	P _s anaerobius	P _s productus	P _s lanceolatus	P _s micros	P _s parvulus
Producción de gas en medio complejo a partir de piruvato	+	+	+	—	—
Olor fétido	+	+	+	—	—
Propionato a partir de Threonina	+	—	—	—	—
Lactato	—	—	—	+	+
Acetato	+	+	+	+	+
C ₃ -C ₆	+	+	+	—	—
Arabinosa	—	W	—	—	d
Fructosa	W	+	—	—	—
Galactosa	—	+	—	—	—
Glucosa	W	+	+	—	+
Lactosa	—	+	—	—	+
Maltosa	W	+	—	—	—
Sacarosa	—	+	+	—	—
Xylosa	—	+	—	—	—
Leche: acidificación de la leche y coagulación	—	+	—	—	+

+ = 90 % ó más de cepas positivas; — = 90 % ó más de cepas negativas; d = variable; W = débil positivo. Todas las especies están en cadenas. No fermentan Adonitol, celulosa, erytriol ó glycopen. No producen - lecitinosa, lipasa ó acetilmetilcarbinol.

Más utilizada en esta clasificación, es la propuesta por Holdeman y Moore (1972) (64) y es la - que nosotros seguiremos.

Establece dos grupos según la tinción de - Gram:

a) Cocos Gram (+).

1.- Parejas y cadenas, requieren hidratos de - carbono.

Ruminococcus.

2.- No requieren hidratos de carbono.

Peptococcus y Peptostreptococcus.

b) Cocos Gram (-).

1.- Producen ácido propiónico y acético a partir de la glucosa.

Veillonella.

2.- Producen ácido butírico y acético a partir de la glucosa.

Acidaminococcus.

Estos ácidos (propiónico, acético y butírico) se determinan por cromatografía gaseosa del cultivo en - un medio base conteniendo glucosa.

Las pruebas que propone este Manual para la identificación de los cocos son:

- a) Tinción de Gram.
- b) Fermentación de azúcares.
- c) Licuación de la gelatina.
- d) Producción de indol y catalasa.
- e) Reducción de los nitratos.
- f) Coagulación de la leche.

Clasificación de Holdeman y Moore de los cocos anaerobios (64)

Especie	Reacción																															
	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Manitol	Salicina	Xilosa	Arabinosa	pH Esculina	Hyd.	Glicerol	Menosa	Melizibiosa	Refinosa	Sorbitol	Rhamnosa	Trehalosa	Geatina	Indol	Nitratos	Leche	Catalasa	Muestras clínicas	Flora normal intestinal	Flora normal urogenital	Flora normal de la boca	Flora normal de la piel	Gas		
<i>Sarcina ventriculi</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	+	a	a	a	a	a	a	a	a	-	-	+	a	-	4	
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	a	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	
<i>Ruminococcus bromii</i>	-	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	
<i>Ruminococcus albus</i>	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	
<i>Peptostreptococcus productus</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	+	v	a	a	a	a	a	a	a	-	-	-	a	-	+	+	4
<i>Peptostreptococcus parvulus</i>	-	-	a	a	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+
<i>Peptostreptococcus micros</i>	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	2
<i>Peptostreptococcus intermedius</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	+	-	a	a	a	a	a	a	a	-	d	-	-	-	-	+	+	+	+	.	.	3
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	2
<i>Peptococcus variabilis</i>	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
<i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Peptococcus prevoti</i>	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	4
<i>Peptococcus morbillorum</i>	a	a	a	a	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
<i>Peptococcus magnus</i>	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	2
<i>Peptococcus constellatus</i>	a	a	a	-	a	a	a	a	a	a	+	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	+	+	+	.	.	.	4
<i>Megaesphaera elsdenii</i>	-	a	a	-	a	a	a	a	a	a	-	-	a	a	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	-	4
"Gaffky" anaerobia	a	a	a	a	a	a	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	a	-	-	-	-	+	4
<i>Acidaminococcus fermentans</i>	-	-	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	.	.	.	2
<i>Veillonella parvula</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	.	.	.	4
<i>Veillonella alcalescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	.	.	.	4

+= reacción positiva; -= reacción negativa; d=reacción débil; v= reacción variable; a= acidez.

II.- MATERIAL Y METODOS

II.1.- PROCEDENCIA DE LAS MUESTRAS

Se ha buscado la presencia de Cocos Gram (+) anaerobios en 592 muestras cuya procedencia ha sido - la siguiente:

Procedencia MAXILOFACIAL

Exudado conducto de Stenon	1
Muelas cariadas	118
Granulomas	3
Abcesos dentarios	<u>4</u>
Total	126

Procedencia O.R.L.

Otitis media crónica	4
----------------------	---

Procedencia BRONCO-PULMONAR

Exudado herida torácica	3
Exudado quiste hidatídico pulmonar	4
Exudados pleurales	12
Aspiración tras-traqueal	<u>5</u>
Total	24

Procedencia ABDOMINAL

Exudados heridas quirùrgicas	101
Exudados peritoneales y absce sos post-quirùrgicos	<u>56</u>
Total	157

Procedencia GENITO-URINARIO

Exudado fondo saco vaginal	1
Pus cuello uterino	1
Pus herida perineal	5
Pus absceso pèlvico	<u>1</u>
Total	8

Procedencia APARATO LOCOMOTOR

Exudado articular	9
Exudado cadera	6
Exudado amputación	4
Exudado úlcera de pie	1
Lesión de pierna	<u>2</u>
Total	22

Procedencia no especificada

Exudados /	180
Abscesos	65
Secreción de fístula	<u>6</u>
Total	251

II.2.- TOMA Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

Todas las muestras se han obtenido evitando su aireación y la contaminación con la flora de territorios vecinos.

Los líquidos purulentos o albergados en vaciedad cerrada se tomaron por punción, previa desinfección de la piel, y se transportaron al laboratorio en la misma jeringa empleada para esta práctica, cuya aguja para evitar la penetración del aire, estaba clavada en un tapón de goma previamente desinfectado. Dado que entre el émbolo y cilindro puede haber un ligero paso de aire, se enviaron rápidamente al laboratorio donde se sembraron en medio sólido (Brain Heart Infusión Agar (BHIA)).

Cuando no fue posible la recogida del exudado purulento en jeringa, se utilizó torunda estéril, que fué inmediatamente sembrada en medio sólido (BHIA) ó en medio líquido (Rosenow), previamente regenerado al baño maría durante quince ó veinte minutos para eliminar el oxígeno disuelto, de modo que el tiempo de contacto de la muestra con el oxígeno atmosférico

fuera prácticamente nulo.

También se ha utilizado torunda estéril en la toma de muestras procedentes de caries dental. Inmediatamente después de la extracción de la pieza dentaria, se introdujo la torunda en la caries, siempre que el tamaño de esta lo permitía, sembrándose a continuación en medio sólido (BHIA).

En ausencia de otros medios más específicos de transporte, de los que no hemos dispuesto en ningún momento, hemos aceptado como aptas para su procesamiento las torundas remitidas en un tubo de Fluid Thioglycollate Medium (Difco), previamente regenerado.

En ocasiones, las muestras llegaron al laboratorio en tubos estériles tapados con algodón. En estas condiciones, se exigió que el tiempo transcurrido entre la obtención y la siembra en medio sólido (BHIA) no fuera en ningún caso superior a quince minutos.

II.3.- METODOS PARA LA OBTENCION DE ANAEROBIOSIS

Para la obtención de anaerobiosis se ha se -
guido la metódica del "Manual de Techniques Bacterio-
logiques" (4ª Edición. 1974) (65).

1.- Métodos físicos.-

- a) Utilización de medios semi-sólidos que li-
mitan la difusión del oxígeno. Para lograru
lo se ha añadido agar al 0,05 % a la base
V-L (viande-levure) líquida.
- b) Empleo de una capa de parafina en superfi-
cie que aisle el medio de cultivo de la at
mósfera ambiental. Es una de las técnicas-
seguidas en el medio de Rosenow.
- c) Siembra en recipientes que exponen una su-
perficie mínima al oxígeno ambiental, como
los tubos de 180x9 mm.
- d) Regeneración de los medios líquidos y semi-
sólidos en baño maría hirviente durante -
quince ó veinte minutos, lo que permite -
eliminar el oxígeno disuelto que contieu -
nen.

2.- Métodos químicos.-

- a) Incorporación a los medios de cultivo de -
sustancias reductoras. Nosotros hemos uti-
lizado el clorhidrato de cisteina, que ade
más puede ser esterilizado en autoclave. -
En determinados medios se ha empleado la -
glucosa que debe su acción reductora a dos
circunstancias (SEBALD 1973) (66).
- Transformación en reductora en medios li
geramente alcalinos y en presencia de -
proteínas a temperaturas próximas a los -
110º C, como sucede al autoclavar los -
distintos medios que llevan glucosa en -
su composición.
 - Porque los metabolitos intermediarios o
finales que producen las bacterias al -
utilizarla tienen propiedades reductoras
- b) Para facilitar la anaerobiosis se ha utili
zado también fragmentos de cerebro de terne
ra que aparte de las sustancias reductoras
que contiene presenta recovecos que prote-
gen y facilitan el desarrollo de gérmenes
anaerobios más exigentes. Esta técnica se
sigue en la preparación del medio de Rose

now.

c) Eliminación del oxígeno ambiental en la propia placa para poder obtener un cultivo en superficie. En nuestro trabajo hemos recurrido al empleo del pirogalol alcalino (BEEERENS 1965) (67) que consiste en una mezcla de carbonato potásico, pirogalol y tierra silíceo que reacciona con el oxígeno eliminándolo, resultando una atmósfera de CO_2 exclusivamente. Por una parte se mezclan el pirogalol y la tierra silíceo en una proporción 1/5 y en el momento de proceder a la siembra de las placas de Petri, se mezcla en un mortero unos 3 gr. de carbonato potásico en polvo con 18 gr. de la mezcla preparada anteriormente. Este conjunto se introduce en una bolsa de papel de filtro que se fija una vez cerrada, en la parte externa de la cubierta de la placa de Petri, mediante dos fragmentos de cinta adhesiva.

Posteriormente se coloca la placa invertida sobre la parte externa de la cubierta que contiene el saqueto, y se cierra hermé

ticamente con una cinta adhesiva. En este trabajo se ha utilizado cinta aislante Panther de 33x25 mm de CRADY.

- d) Jarras para anaerobios: Son recipientes cerrados donde se elimina el oxígeno al combinarlo con distintas sustancias en presencia de catalizadores.

En nuestro trabajo hemos utilizado el "sistema Gas Pak" de BALTIMORE BIOLOGICAL LABORATORY (BBL), diseñada por Brewer y Allgeier en 1960 para el aislamiento y cultivo de microorganismos anaerobios

Este sistema Gas Pak consta de:

1. Jarra: constituida por un recipiente de polícarbonato resistente y rígido, capaz de soportar temperaturas del autoclave de 121° durante 15 minutos. Las dimensiones de los modelos que hemos utilizado son: diámetro exterior 17 cm, diámetro interior 11,5 cm, altura 28,5 cm.
2. Tapa: del mismo material, lleva en su cara interior un panel metálico que encierra un catalizador (aluminio y paladio), se cierra herméticamente mediante una junta elás-

- tica interpuesta entre jarra y tapa, y -
una mordaza, ajustada mediante un sistema
de tornillo. Después de un cierto número -
de operaciones, se deben regenerar los ca -
talizadores calentándolos a 160° durante -
hora y media o dos horas en horno Pasteur
3. Saquetes "Gas Pak": El saquete "Gas Pak" -
encierra dos comprimidos: uno de borohi -
druro de sodio, generador del hidrógeno y
otro de bicarbonato y ácido cítrico, gene -
rador del gas carbónico.
 4. Indicador de anaerobiosis: constituido por
un sobre que encierra una banda de papel -
de filtro embebido en una solución de azul
de metileno. En presencia del oxígeno toma
color azul, decolorándose cuando todo el -
oxígeno se ha combinado con el hidrógeno -
presente.

TECNICA

Se colocan las placas en las jarras con un
indicador de anaerobiosis. Se rasga por un extremo el
sobre Gas Pak, se introduce 10 ml. de agua, y se coloca
en el interior de la jarra. Se tapa, se coloca la mor

daza en su posición y se aprieta a mano el tornillo. El hidrógeno producido por el sobre Gas Pak reacciona con el oxígeno en presencia del catalizador y se produce la atmósfera anaerobia. También se produce CO_2 en cantidad suficiente para mantener el crecimiento de las cepas anaerobias difíciles que a veces no crecen en ausencia de este gas.

Durante la incubación se pueden detectar las condiciones anaerobias fácilmente. Cuando la reacción tiene lugar, se observa una condensación de agua, como una visible niebla o bruma en la superficie interior de la jarra y por un calentamiento moderado de la tapa sobre el catalizador. Si no ocurre condensación apreciable en 30 minutos debe sustituirse el catalizador.

El indicador debe perder su color cuando se reduce el azul de metileno al desaparecer el oxígeno. Cuando los signos de anaerobiosis empiezan a manifestarse las jarras se incuban en estufa a 37° durante cuarenta y ocho horas.

II.4.- MEDIOS DE AISLAMIENTO Y ENRIQUECIMIENTO

Las siembras en medios de aislamiento y enriquecimiento, se han realizado siempre antes de que - transcurrieran más de quince minutos desde la obtención de la muestra para evitar en lo posible el efecto tóxico del O₂ sobre la flora anaerobia.

Los medios empleados para el aislamiento de las muestras han sido:

BRAIN HEART INFUSION AGAR, Difco, (BHIA).

Extracto de Carne-Extracto de Levaduras-Sangre (VLS).

Extracto de Carne-Extracto de Levaduras en tubos de 180x9 mm (VL profundo, VLP).

Como medio de enriquecimiento, se empleó únicamente el medio Rosenow.

MEDIOS

1. BRAIN HEART INFUSION AGAR (BHIA), cuya - preparación y composición es la siguiente (HOLDEMAN y - MOORE) (64).

BHIA (Difco)	52 g.
Extracto de Levaduras (Difco)..	5 g.
Clorhidrato de cisteina (Merck)	0,3 g.
Bacto-agar (Difco)	20 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se disuelve el BHIA, extracto de levaduras, clorhidrato de cisteina y bacto-agar en 1000 ml. de agua destilada con ayuda de ebullición, se ajusta el pH a 7.4 y se esteriliza en autoclave a 120º durante veinte minutos.

Cuando el medio se enfria y alcanza 50º C , se añaden 5-10 % de sangre lacada de caballo (sumi - nistrada por Laboratorios Llorente) que posteriormente se sustituyó por sangre humana sin que aparentemente surgieran diferencias importantes. La sangre lacada se ha obtenido mediante tres congelaciones y descongelaciones sucesivas. El medio tiene una concentración final de 35 grs/litro de Agar-Agar, que limita el crecimiento en velo de Proteus.

Todo el conjunto se agita suavemente para no formar burbujas y evitar la aireación y se repar-

te en placas de Petri de cristal de 12 cm. de diáme -
tro a razón de unos 20 ml. por placa.

Las placas que no se usan se pueden conserer -
var a temperatura ambiente durante un día, mejor que-
a la temperatura de 49 C para prevenir el incremento-
de la absorción de oxígeno que tiene lugar a bajas -
temperaturas (MARTIN) (68). Este medio se usa para -
aislamiento en superficie y estudio de la sensibilidad -
a los antibióticos.

La siembra se realiza haciendo una disemina-
ción de la muestra con una torunda empezando en el ex-
tremo de un diámetro e imprimiendo un movimiento de -
zig-zag bastante apretado perpendicular a dicho diáme-
tro con el fin de que descargue la mayor cantidad po-
sible de las bacterias sobre esta zona, aproximadamente
la mitad de la placa. Después con el asa de plati-
no estéril, se extiende en estria apretada sobre la -
parte no sembrada para conseguir el crecimiento de co-
lonias separadas.

Cuando se trata de un producto líquido, se -
deposita una gota de la muestra con una pipeta Paso -

teur en el extremo de la placa y se hace la siembra - con asa de platino estéril.

Se siembran siempre tres placas, que se incuban a 37° en aerobiosis, atmósfera con un 5-10 % de CO₂ y en anaerobiosis respectivamente. Cuando se utiliza la técnica del pirogalol alcalino para producir la anaerobiosis deben utilizarse placas de vidrio, ya que en algunos lotes de placas de plástico no se consigue la anaerobiosis posiblemente a causa de la penetración de aire a través de los poros.

A las 48 horas de incubación, las colonias - obtenidas son examinadas con lupa binocular a 125 y - 200 aumentos, y aisladas en una nueva placa de medio BHIA por siembra en cuadrantes con pipeta Pasteur cerrada. De este modo pueden hacerse en la misma placa - unos seis aislamientos de colonias distintas.

2. Medio EXTRACTO DE CARNE-EXTRACTO DE LEVADURAS (VL). La composición y preparación es la siguiente: (65)

Base V.L.

Peptona tripsica (Difco)	10 g.
Cloruro sódico (Merck)	5 g.
Extracto de Levaduras (Difco)	5 g.
Extracto de carne (Difco)	2 g.
Clorhidrato de cisteina (Merck)	0,3 g.
Agua destilada	1000 ml.

Se ajusta el pH a 7.4-7.5.

Esta base sirve para preparar numerosos me -
dios.

2.1.- MEDIO PARA CULTIVO DE SUPERFICIE:(VLS)

Glucosa(Merck)	2 g.
Bacto-agar (Difco)	20 g.
BASE V.L.	1000 ml.

Se disuelve por ebullición, se filtra y se -
esteriliza en autoclave a 120° durante veinte minu -
tos. Cuando el medio se enfría y alcanza 50° C se aña
de 5-10 % de sangre lacada. Todo el conjunto se agita
suavemente para no formar burbujas y evitar la airea-

ción. Se reparte en placas Petri de cristal de 12 cm-
de diámetro a razón de 20 ml. por placa. Las siembras
y aislamiento se efectúan igual que para el medio -
BHIA.

2.2.- Medio EXTRACTO DE CARNE-EXTRACTO DE LE
VADURAS en profundidad. (VLP) (65).

Se prepara añadiendo a la base V.L. an-
teriormente descrita:

Glucosa (Merck)	2 g.
Bacto-Agar (Difco).....	6 g.
Base líquida V.L.	1000 ml.

Se filtra y se reparte en tubos de 180x9 mm.
a razón de 5 ml. por tubo. Los tubos se tapan con al-
godón y se esterilizan en autoclave a 115º durante -
veinte minutos. Una vez frios se guardan en nevera pa
ra evitar su desecación, y en el momento de su uso se
regeneran al baño maría hirviendo duante veinte minu-
tos para eliminar el oxígeno disuelto. La siembra se
efectúa en este medio cuanto está fundido y a la tem
peratura de 45º, para lo cual una vez regenerado se -

conserva en baño maría.

Siempre se ha efectuado la siembra en este medio a partir de una placa de VLS ó BHIA incubada en anaerobiosis durante cuarenta y ocho horas.

Las distintas colonias aisladas en placa o reaisladas en cuadrantes se resiembran en VLP previamente regenerado y posteriormente enfriado a 45º C. La siembra se hace con pipeta Pasteur cerrada con movimientos repetidos ascendentes y descendentes y a la vez de rotación de la pipeta. La incubación se hace siempre a 37º C durante el tiempo suficiente para que el crecimiento sea evidente lo que en el caso de los cocos anaerobios es, al menos, de 48 horas.

Los gérmenes anaerobios estrictos crecen en toda la altura de la columna de medio salvo en una zona más próxima a la superficie en la que el potencial redox es alto por difusión del O₂ atmosférico.(pág.71)

3. Medio de enriquecimiento: ROSENOW (65).

Su composición es:

Peptona tripsica (Difco)	10 g.
Cloruro sódico (Merck)	5 g.
Extracto de carne (Difco)	3 g.
Glucosa (Merck)	2 g.
Indicador de Andrade	10 ml.
Agua ordinaria	1000 ml.

Todos los componentes excepto la glucosa y - el indicador de Andrade, se disuelven en el agua con ayuda de ebullición durante diez minutos. Se ajusta - el pH a 7.2 y previa filtración por papel se añade la glucosa y el indicador de Andrade (solución de fuchina ácida en agua destilada al 5 %). El líquido toma - un tinte rosado si el pH es correcto. En caso contrario, la coloración es roja franca y debe añadirse un poco de sosa muy diluída hasta obtener el pH deseado. Se reparte en tubos de 200x20 mm (20 ml.) ó de 160x16 mm (12 ml.) en los que se ha colocado previamente un trocito de marmol blanco y un fragmento de cerebro de buey o cordero, del volumen del grueso de una avellana, limpio de meninges y vasos superficiales.

Se esteriliza en autoclave a 120° durante - veinte minutos y se emplea siempre recién preparado ,

puesto que a partir de los quince días a temperatura ambiente, el cerebro se altera rápidamente y la regeneración al baño maría hirviente es incapaz de restituirle su valor primitivo.

Previa regeneración se sembraron las muestras:

- Cuando se trataba de torundas, el vástago de la torunda fue partido haciendo palanca en la boca del tubo, de tal manera que finalmente la torunda propiamente dicha quedaba en el fondo, en contacto con el trozo de cerebro.

- Para la siembra de un cultivo puro en medio de VLP utilizamos varillas estériles y no estiradas, a modo de pipetas, de unos veinte centímetros de longitud y diámetro externo inferior al diámetro interno del tubo de VLP. Aprovechando la poca consistencia del VLP es posible aspirar el contenido del tubo que se resiembra en medio Rosenow.

El medio Rosenow se cubre en todos los casos después de sembrado con una capa de parafina fundida y previamente esterilizada de 1 cm de grosor aproximada-

mente, para evitar la difusión del O_2 . La incubación se realiza a $37^{\circ}C$ durante el tiempo necesario para que el crecimiento sea evidente, generalmente no menos de 48 horas para los cocos anaerobios.

En este medio se pueden observar los fenómenos siguientes:

1). Fermentación de la glucosa: Se manifiesta por el cambio del indicador de Andrade. Se produce en las primeras horas del cultivo al contacto con el cerebro, allí donde las bacterias comienzan a multiplicarse. El color varía del rosa al rojo carmín. Se atestigua la acidificación por la fermentación más o menos pronunciada del azúcar. Cuando se tarda en hacer la lectura el indicador se decolora por reducción y el virage en la zona ácida no se detecta.

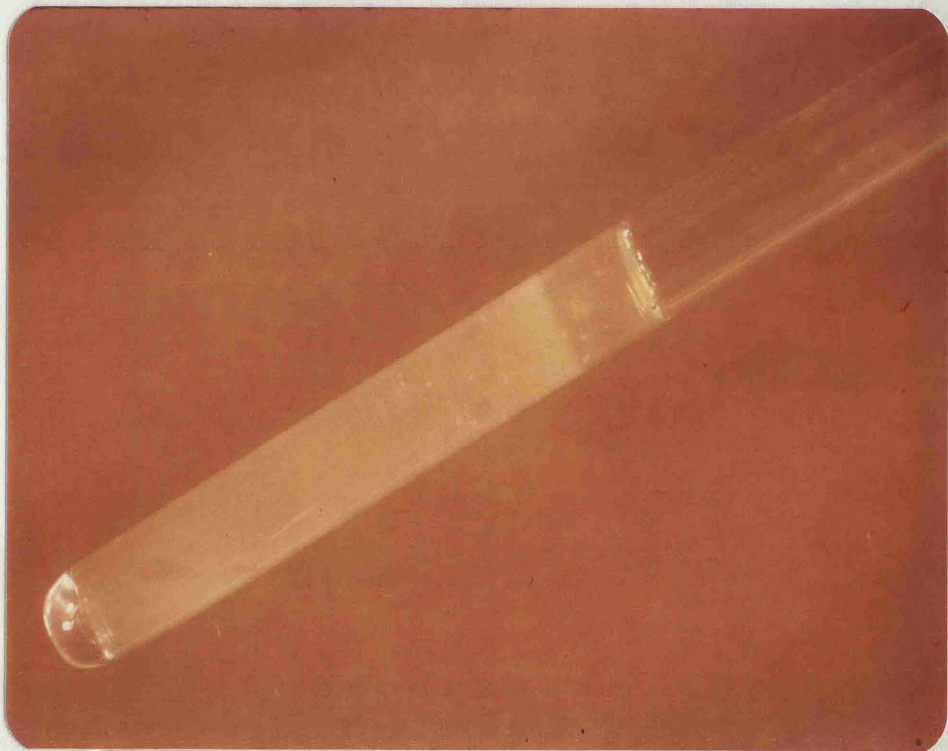
2). Poder reductor: Después de la fermentación el medio se puede decolorar o se convierte en verdoso. La decoloración traduce el poder reductor del germen. El virage a verde se observa con las bacterias reductoras poco o nada glucidolíticas, a ve -

ces proteolíticas o alcalinizantes.

3). Producción de gas: Se manifiesta por una elevación más o menos pronunciada del disco de parafina. Cuando sube hasta el tapón que cierra el tubo el desprendimiento de gas se nota como (++++), a mitad de altura entre la superficie y el tapón (+++), cuando está apenas elevado con presencia de una gruesa burbuja de gas (+).

Esta apreciación debe tener en cuenta un error: el gas llega a veces a escaparse parcialmente entre la parafina y la pared del tubo, y su volumen está por tanto artificialmente reducido.

Una vez que tenemos un cultivo puro sembrado en medio Rosenow, se pasa a las pruebas de identificación.



Observación del crecimiento de un anaero -
bio estricto en tubos de VLP

II-5.- IDENTIFICACION

La identificación de los Cocos Gram (+) anaerobios aislados se ha realizado por dos técnicas:

II.5.1.- Según métodos convencionales, del "Anaerobe Laboratory Manual" 3ª Ed.(64).

II.5.2.- Utilización del "Sistema API 20 ANAEROBES" fabricado por Analytab Products Inc y distribuido por Gustavo Reder y CIA (S.R.C.).

Todas las pruebas de identificación se hicieron a partir del medio Rosenow, y fueron las siguientes

- a) Tinción de Gram.
- b) Licuación de la gelatina.
- c) Fermentación de azúcares.
- d) Determinación de la producción de indol.
- e) Reducción de los nitratos.
- f) Estudio de la producción de catalasa.
- g) Acción sobre la leche.

a) TINCION DE GRAM.

Este método sirve para diferenciar los dos -
grandes grupos de microorganismos: Gram positivos y -
Gram negativos, permitiendo asimismo observar la morfo-
logía de los mismos.

A partir de un tubo con medio Rosenow, se -
perfora la capa de parafina con un punzón caliente y -
con una pipeta Pasteur estéril, se toma una pequeña -
cantidad del fondo del tubo que se extiende sobre la -
mitad de un portaobjetos de modo que quede una capa -
delgada.

Cuando se abre un tubo de Rosenow debe sembrarse
se otro tubo del mismo medio. La siembra se hace pasan-
do de medio a medio una pipeta Pasteur completa.

b) LICUACION DE LA GELATINA.

Se toma de un tubo de Rosenow con el gérmen a
estudiar una pipeta Pasteur completa y se introduce en
otro tubo del mismo medio previamente regenerado y en-
friado, se añade un disco de Kohn que contiene gelati-

na y carbón animal. En nuestro trabajo hemos utilizado los suministrados por "B-D Mérieux". Se tapa el tubo con parafina y se incuba a 37° durante diez a quince días. Si el germen posee gelatinasa el disco se rompe y queda libre el carbón animal que se dispersa dando un depósito negro en el fondo del tubo. En caso que el germen no posea gelatinasa el disco queda intacto.

c) FERMENTACION DE LOS HIDRATOS DE CARBONO.

El medio utilizado para la fermentación de azúcares es el siguiente (65):

Medio VL semisólido	100 ml.
Hidrato de Carbono a estudiar (Difco)	1 g.

El medio VL semisólido se compone de:

Base VL	1000 ml.
Bacto-Agar (Difco)	0,5 g.

Se disuelve el hidrato de carbono en el medio-VL semisólido. Se reparten 10 ml. en tubos de 160x16 mm, se esteriliza en autoclave a 115°C durante veinte mi

minutos. En el caso de arabinosa, xilosa, salicina, sorbitol, ramnosa y galactosa, se añade a la base se misólida VL estéril repartida en tubos, soluciones estériles de estos azúcares obtenidos mediante fil - tración sobre bujía Chamberland L₃, filtro Seitz ó - filtro Millipore.

Los tubos a utilizar se regeneran al baño - maría durante veinte minutos y cuando alcanzan 45º - se siembran cada uno con una pipeta Pasteur completa de medio Rosenow, se incuban a 37º durante diez o - quince días, al cabo de las cuales se adiciona a cada tubo 10-15 gotas del indicador universal (Merck)- se agita y pueden aparecer tres coloraciones.

Verde: No acidificación pH 6-7

Naranja-amarillo: Débil acidificación pH

5,5-6

Rojo: Fuerte acidificación pH 5.

Hemos considerado reacción positiva cuando - el pH era inferior a 5,5. Débilmente positiva cuando oscilaba entre 5,5-6 y negativa cuando era superior - a 6. En todos los casos se sembró un testigo (base -

V.L. semisólida) que no contenía azúcar.

d) DETERMINACION DE INDOL

Se estudia la producción de indol a partir -
del triptófano de la peptona.

Técnica: Se regeneran los tubos de VL semisó-
lido y se dejan enfriar a 45º, se introduce una pipe-
ta Pasteur completa de la suspensión bacteriana en me-
dio de Rosenow y se incuban a 37º durante 10-15 días-
al cabo de los cuales se añaden 3-4 gotas del reacti-
vo de Ehrlich, resbalando por las paredes.

Composición del reactivo de Ehrlich:

Se disuelven 4 g. de p-dimetilaminobenzal -
dehido en 380 ml. de alcohol etílico a 95º y se añ-
den 80 ml. de ClH concentrado.

En el caso de que se haya producido indol ,
en la zona de separación aparece un color rojo.

e) REDUCCION DE LOS NITRATOS

Con esta prueba se observa si la bacteria -

reduce los nitratos a nitritos. El medio empleado es (65):

Medio VL semisólido	1000 ml.
Glucosa (Merck)	2 g.
Nitrato sódico	5 g.

Disolver la glucosa y el nitrato sódico en el medio VL semisólido. Se reparten 10 ml. en tubos de 160x16 mm, se esteriliza en autoclave a 115° durante 20 minutos.

Técnica: Se regeneran los tubos del medio descrito y se dejan enfriar, se introduce una pipeta Pasteur completa de la suspensión bacteriana en medio de Rosenow y se incuban a 37° durante diez o quince días. Transcurrido el tiempo se añade ácido sulfanílico al 8% en ácido acético 5N y alfa naftilamina al 5% en ácido acético 5N. Si los nitratos han pasado a nitritos, aparecerá un color rojo ladrillo con precipitado característico. En caso contrario no se altera el color o es apenas anaranjado. Si la reacción es negativa o dudosa, para confirmarlo debe añadirse polvo de zinc: si no ha habido reacción, aparece un color -

lor rojo.

f) ESTUDIO DE LA PRODUCCION DE CATALASA

Para la realización de esta prueba se utiliza el medio de Rosenow.

Técnica: Se añaden unas gotas de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes a un tubo de medio Rosenow con crecimiento bacteriano. La reacción es positiva cuando se producen burbujas de oxígeno, siendo negativa en caso contrario.

g) ESTUDIO DE LA ACCION SOBRE LA LECHE.

Se utiliza leche cisteinada cuya composición es: (65)

Leche descremada	1000 ml.
Clorhidrato de cisteina (Merck)...	0,8 g.

Se disuelve el clorhidrato de cisteina, se ajusta el pH 7.3-7.4 y se reparte a razón de 10 ml. en tubos de 160x16 mm. Se esterilizan a 115º C duran-

te 30 minutos.

Técnica: Se regenera el tubo de leche cisteinada y se enfría a 45º C, se añade una pipeta Pasteur completa en medio Rosenow crecido y se incuba dos o tres semanas a 37º C.

Al cabo de este tiempo la leche puede estar:

- No modificada.
- Coagulada sin retracción del coágulo.
- Coagulada con retracción del coágulo.
- Coagulada con coágulo retractado y alveolado.
- Digerida.

IDENTIFICACION POR MEDIO DEL SISTEMA "API 20
ANAEROBES".

El "Sistema API 20 ANAEROBES" es una tira - con 20 cápsulas que permite buscar 20 caracteres bioquímicos para la identificación de bacterias anaerobias.

Para su empleo, a partir de un cultivo puro de medio Rosenow, se depositan dos gotas de la suspensión bacteriana con una pipeta Pasteur en dos placas de medio BHIA, y se hace una extensión con un asa de platino estéril. Una de las placas se incuba 48 horas en anaerobiosis y otra en aerobiosis para verificar el carácter anaerobio de la cepa a estudiar.

El sistema consta de una caja de incubación individual, (fondo con alveolos y cubierta). Una tira con 20 túbulos cada uno correspondiente a un carácter bioquímico distinto, y un tubo con medio enriquecido y cerrado.

Composición del medio:

Triptona	5 g.		
E.Levadura	5 g.	Vitamina K ₃	0,01 g.
ClNa	2,5 g.	Sulfito sódico	0,1 g.
L-triptófano ...	0,2 g.	Agua destilada	1000 ml.
L-cistina	0,4 g.		
Hémina	0,01 g.		

pH 7-7,2

Técnica: Se llenan los alveolos del fondo de la caja con 5 ml. de agua en cada uno, se saca la tira de su envase estéril y se coloca en la caja. Se abre el tubo de medio enriquecido y se hace una suspensión bastante densa del germen crecido en medio BHIA en anaerobiosis, manteniéndose en una anaerobiosis lo más estricta posible. Con ayuda de una pipeta Pasteur, con la punta colocada sobre un lado de la cúpula del túbulo, se añade la suspensión evitando que se formen burbujas (inclinando ligeramente la caja) se llena el túbulo y con otra pipeta Pasteur estéril, se llena la cúpula con aceite de parafina estéril dando una anaerobiosis suficiente para la mayor parte de los gérmenes anaerobios encontrados.

Se tapa la caja y se incuba a 37° C durante 48 horas.

Los resultados obtenidos se leen del siguiente modo:

a) FERMENTACION DE GLUCIDOS: 16 de los 20 sustratos - de la tira "API 20 A" son glúcidos con púrpura de bro cresol como indicador de pH para observar la producción de ácidos en caso de fermentación:

<u>Reacción</u>	<u>Color</u>
Producción de ácidos	Amarillo
No producción de ácidos	Púrpura

b) PRODUCCION DE INDOL: Para obtener el resultado de la prueba del indol, se añade una gota de xileno en la cúpula y después de algunos minutos, se añade una gota de reactivo de Ehrlich. La aparición de un color rojo indica la presencia del indol, un amarillo indica reacción negativa.

c) ALCALINIZACION DE LA UREA: El túbulo contiene urea tamponada a pH 6,3 y rojo fenol. Una actividad ureási

ca produce amoniaco que eleva el pH y da lugar a una -
coloración roja.

d) PROTEOLISIS DE LA GELATINA: El túbulo contiene gelat
tina con formol (tipo disco de Kohn) sobre un soporte-
especial. La proteolisis de la gelatina libera partícul
las negras que difunden y dan una coloración negra. En
caso de reacción negativa no hay difusión y el medio -
queda incoloro.

e) HIDROLISIS DE LA ESCULINA: El túbulo contiene un med
dio que adopta color marrón-negro si la esculina es -
hidrolizada. La reacción comienza en la parte superior
del túbulo; en caso de reacción lenta, puede obtenerse
coloración solamente a este nivel. Las bacterias fuer-
temente sulfídricas positivas, puede producir una color
ración negra en el fondo del tubo. Esto debe interpre-
tarse como esculina negativa. Las reacciones dudosas -
se confirman mediante una lámpara de U.V. (366 mμ).Una
fluorescencia positiva indica una ausencia de esculina
hidrolizada.

f) DETERMINACION DE LA CATALASA: La prueba se hace aña
diendo una o dos gotas al 3% de H₂O₂ en uno de los tu-

bos, excepto en indol. La rápida aparición de burbujas indica la presencia de catalasa.

II.6.- ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

Se ha estudiado la sensibilidad de las cepas de Cocos Gram (+) aislados en nuestro trabajo frente a ocho antibióticos y al Polyanetol sulfonato-sódico (SPS), que inhibe el crecimiento del Peptostreptococcus anaerobios (GRAVE) (69).

El método utilizado ha sido el de disco-placa en el que se ha introducido una modificación del proce - der de BAUER y col. (70).

1º- MEDIO DE CULTIVO.- Se ha utilizado el medio BHIA preparado siempre el día anterior a la realización de la prueba para evitar una excesiva oxidación y sus componentes, y no se guardó en frigorífico, ya que en éste la absorción de oxígeno es mayor. (DOWEL y col.) (71).

2º- INOCULO.- Se empleó como base de cultivo de 18 horas en medio Rosenow que había sido sembrado - previa regeneración y posteriormente parafinado. Esta suspensión de bacterias en fase logarítmica (Wahren y col.) (72) fue diluída en solución salina, hasta obte-

ner una densidad visual equivalente a la de un patrón standard, preparado añadiendo 0.5 ml. de cloruro bárico, 0.048 M. (1.175 % peso/volumen de cloruro bárico $2H_2O$) a 99.5 ml. de ácido sulfúrico 0.36N (1 % volumen/volumen) (Matsen y col.) (73).

Este patrón ha sido propuesto para las pruebas con anaerobios por (SUTTER y col.) (74) y equivale a la mitad de la densidad del patrón nº 1 en la escala de MACFARLAND.

3º- SIEMBRA.- Se hizo con una torunda estéril embebida en el inóculo que para eliminar el exceso de cultivo absorbido se presionó contra las paredes del tubo. El inóculo se repartió uniformemente sobre la superficie de la placa y deslizando la torunda en dos direcciones perpendiculares.

4º- TIPO DE DISCOS EMPLEADOS:

<u>Antibióticos</u>	<u>Firma distribuidora</u>	<u>Carga</u>
Penicilina	Difco	10 unidades
Ampicilina	Difco	10 µg.
Cephalotina	Difco	30 µg.

Tetraciclina	Difco	30 µg.
Clindamicina	Difco	2 µg.
Chloramphenicol	Difco	30 µg.
Erythromycina	Difco	15 µg.
Carbenicilina	Difco	100 µg.
S.P.S.	Roche	20 µl.

Los discos se mantienen almacenados a -14°C - con sustancias higroscópicas, con lo que se evita la pérdida de potencia, en especial de Penicilinas y Cefalosporinas. Las que están al uso se conservan a 4°C y antes de su empleo se dejan un tiempo a temperatura ambiente para evitar la condensación (MATSEN y col.)(73).

Se colocan sobre la placa con unas pinzas que se esterilizan por flameado tras la aplicación de cada disco. Para cada germen, hemos utilizado dos placas, en una se colocan cuatro discos de antibióticos y en la otra los otros cuatro y el de SPS en el centro. Estaban separados 2 cm. de las paredes de la placa, de esta forma se evita el entrecruzamiento de las zonas de inhibición.

Una vez colocados, se presionan suavemente so-

bre el medio de cultivo con las pinzas para obtener -
una buena difusión.

50- INCUBACION DE LAS PLACAS.- Inmediatamen-
te después de colocar los discos, se introdujeron las
placas en jarras para anaerobios obteniéndose la anaerobiosis por medio de los sobres Gas Pak, e incubándose a 37° C.

60- LECTURA.- Se hizo a las 48 horas después
de iniciada la incubación. El halo de inhibición se -
midió con un calibre cuyos extremos se situaban a la-
altura de la superficie de la placa

III.- RESULTADOS

Se han estudiado 592 muestras de personas - cuyas edades eran diversas y sin distinción de sexos. De ellas se han aislado 115 cepas de cocos anaerobios Gram (+).

La numeración de cepas han sido del 1 al 112 desingándose con letras aquellas en las que apareció más - de una especie de cocos anaerobios.

En casi todas ellas aparecieron mezclados cocos anaerobios Gram (+) con bacterias aerobias. En ocasiones también aparecieron bacilos anaerobios Gram (-), generalmente Bacteroides del grupo "frágilis" y cocos anaerobios Gram (-) pertenecientes al Género Veillonella. Estos últimos aparecieron en las muestras procedentes de cavidad oral en una proporción bastante elevada.

Sólamete en tres ocasiones aparecieron cocos Gram (+) en cultivo puro e igualmente en tres ocasiones apareció más de una especie de cocos anaerobios Gram (+) en el mismo cultivo.

Las pruebas realizadas para la identificaca -

ción de cepas encontradas por fermentación de azúcares -
tanto por métodos convencionales como por el "SISTEMA API
20 ANAEROBES" se presentan en los cuadros siguientes.

II-1.- IDENTIFICACION POR METODOS CONVENCIONALES DE LOS COCOS ANAEROBIOS GRAM (+) AISLADOS

Especies \ Reacción	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
1 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2 Peptoestreptococcus intermedius	d	d	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-
3 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
4 Peptoestreptococcus intermedius	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
5b Peptoestreptococcus productus	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
5c Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
7 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8 Peptoestreptococcus productus	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
9 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

d= reacción débil; + = reacción positiva; - = reacción negativa;

Reacción		Especies											
		Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
10	Peptoestreptococcus intermedius	d	d	+	+	+	+	-	-	d	-	+	+
11	Peptoestreptococcus productus	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
12d	Peptoestreptococcus productus	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
12j	Peptoestreptococcus intermedius	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
13	Peptoestreptococcus intermedius	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
14	Peptoestreptococcus intermedius	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
15	Peptoestreptococcus intermedius	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
16	Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
18	Peptoestreptococcus parvulus	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	+	-
19	Peptoestreptococcus intermedius	d	d	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
20	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Reacción		Especie											
		Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
21	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
22	Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
24	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
25	<i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
26	<i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
27	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
28	Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	<i>Peptococcus constellatus</i>	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
30	<i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
31	<i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
32	<i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-

Especie \ Reacción	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
33 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
34 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
35 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
36 <i>Gaffkya anaerobia</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
37 <i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
38 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-	-	-
39 <i>Peptococcus prevotii</i>	-	-	d	-	-	-	d	-	d	d	+	-
40 <i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
41 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42 <i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
43 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-

Especie	Reacción												
	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas	
45 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
46 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
47 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
48 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
49 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
50 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
51 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
52 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
53 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	
54 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	
55 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
56 <i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++	

Especie \ Reacción	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
57 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
58 <i>Gaffkya anaerobia</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
59 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
60 <i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+
61 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
62 <i>Peptococcus sacharolyticus</i>	-	+	d	-	d	d	d	-	+	+	+	-
63 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
64 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
67 <i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
68 <i>Peptoestreptococcus micros</i>	-	-	d	-	-	-	-	-	-	d	-	-

Reacción		Especie											
		Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
69	<i>Peptococcus sacharolyticus</i>	-	+	+	-	d	d	-	-	+	+	+	-
70	<i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
71	<i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
72	<i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
73	<i>Peptoestreptococcus micros</i>	-	-	d	-	-	d	-	-	-	d	-	-
74	<i>Peptococcus sacharolyticus</i>	-	+	+	-	d	d	-	-	+	+	+	-
75	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	d	-	-	-	+	-	-	-	-	-
76	<i>Peptococcus aerogenes</i>	-	d	d	-	+	+	d	+	-	-	d	+++
77	<i>Peptoestreptococcus micros</i>	-	-	+	-	-	d	-	-	-	d	-	-
78	<i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	d	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
79	<i>Peptococcus constellatus</i>	d	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
80	<i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Especie \ Reacción	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
81 Peptoestreptococcus productus	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
82 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
83 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
84 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
85 Peptoestreptococcus intermedius	d	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
86 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
87 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
88 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
89 Peptoestreptococcus intermedius	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
90 Peptococcus constellatus	d	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
91 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
92 Peptococcus constellatus	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-

Especie	Reacción											
	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
93 <i>Peptococcus constellatus</i>	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
94 <i>Peptococcus constellatus</i>	d	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-
95 <i>Peptococcus variabilis</i>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
96 <i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+
97 <i>Gaffkya anaerobia</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
98 <i>Peptoestreptococcus intermedius</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
99 <i>Gaffkya anaerobia</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
100 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
101 <i>Peptoestreptococcus micros</i>	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-
101b <i>Peptococcus sacharolyticus</i>	-	-	+	-	-	-	d	-	d	+	+	-
102 <i>Peptoestreptococcus productus</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
103 <i>Peptococcus asacharolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Especie \ Reacción	Celobiosa	Fructosa	Glucosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Gelatina	Indol	Nitratos	Catalasa	Leche	Gas
104 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
105 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
106 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
107 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
108 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
109 Sin identificar	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
110 Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
111 Peptoestreptococcus intermedius	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-
112 Peptococcus asacharolyticus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

A las cepas números 2,4,5b,8,10,11,12d,12f, 13,14,19,25,26,27,30,32,42,44,54,60,63,78,81,85,89,96, 98,100,102,111, que daban resultados comunes a *Peptostreptococcus productus* y *Peptostreptococcus intermedium*, se les hicieron pruebas de fermentación de: Manitol, Ramnosa, Sorbitol y Xilosa.

Los resultados se presentan en la tabla siguiente:

nº cepa	Reacción				ESPECIE
	Manitol	Ramnosa	Sorbitol	Xilosa	
2	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>
4	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>
5b	+	+	+	d	<i>Ps. productus</i>
8	+	+	+	+	<i>Ps. productus</i>
10	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>
11	+	+	+	+	<i>Ps. productus</i>
12d	d	+	+	+	<i>Ps. productus</i>
12f	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>
13	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>
14	-	-	-	-	<i>Ps. intermedius</i>

+ = reacción positiva; - = reacción negativa; d = reacción débil

nº cepa	Manitol	Ramnosa	Sorbitol	Xilosa	ESPECIE
15	-	-	-	-	Ps. intermedius
19	-	-	-	-	Ps. intermedius
25	+	+	+	+	Ps. productus
26	+	+	+	+	Ps. productus
27	+	+	+	+	Ps. productus
30	-	-	-	-	Ps. intermedius
32	-	-	-	-	Ps. intermedius
35	+	+	+	+	Ps. productus
42	-	-	-	-	Ps. intermedius
44	+	+	+	+	Ps. productus
54	+	+	+	+	Ps. productus
60	-	-	-	-	Ps. intermedius
63	+	+	+	+	Ps. productus
78	-	-	-	-	Ps. intermedius
81	+	+	+	+	Ps. productus
85	-	-	-	-	Ps. intermedius
89	d	-	-	-	Ps. intermedius
96	d	-	-	-	Ps. intermedius
98	-	-	-	-	Ps. intermedius
100	+	+	-	+	Ps. productus
102	+	+	+	+	Ps. productus
111	-	-	-	-	Ps. intermedius

III. IDENTIFICACION DE LAS ESPECIES AISLADAS POR EL SISTEMA "API 20 ANAEROBES"

Reaccion Especie		Gas	Indol	Urea	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Xyloso	Arabinosa	Gelatina	Erculina	Glicerol	Celobiosa	Manosa	Melizibiosa	Refinosa	Rhamnosa	Trehalosa	Catalasa	Sorbitol
1	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*2	Peptostreptococcus intermedius	-	-	+	-	+	+	+	d	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
3	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*4	Peptostreptococcus intermedius	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	d	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
5b	Peptostreptococcus productus	-	-	+	+	+	+	+	+	+	d	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
5c	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Peptostreptococcus productus	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	d	+	+	+	+	+	+	+	-	+
9	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Peptococcus intermedius	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-
*11	Peptostreptococcus productus	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
12d	Peptostreptococcus productus	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
12	Peptostreptococcus intermedius	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
*13	Peptostreptococcus intermedius	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
*14	Peptostreptococcus intermedius	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
15	Peptostreptococcus intermedius	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
16	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
*18	Peptostreptococcus parvulus	-	-	d	-	+	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Peptostreptococcus intermedius	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
20	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	S. I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = reacción positiva; - = reacción negativa; d = reacción débil

Reacción		Especies																					
		Cas	Indol	Urea	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Xyloso	Arabinosa	Selatina	Esculina	Glicerol	Celobiosa	Manosa	Meliabiosa	Rafinosa	Knamrosa	Trehalosa	Catalasa	Sorbitol
51	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
52	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	Peptostreptococcus productus	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+
55	S. I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	Peptococcus aerogenes	+	+	-	d	d	-	+	+	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	d	-	d	-
57	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	Gaffkya anaerobia	-	-	-	+	+	-	+	+	d	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	d	-
59	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	Peptostreptococcus intermedius	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	d	+	-	-	-	-	-	-	-
61	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
62	Peptococcus sacharolyticus	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-	d	-	+	-	d	-	-	-	-	+	-	-
63	Peptostreptococcus productus	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
64	S. I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	S. I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
66	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	Peptococcus aerogenes	+	+	-	d	d	-	d	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	d	-	d	-
68	Peptostreptococcus micros	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	d	-	-
69	Peptococcus sacharolyticus	-	-	-	d	-	-	d	d	-	-	d	-	+	-	d	-	-	-	-	+	-	-
70	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
71	Peptococcus asacharolyticus	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	Peptococcus aerogenes	+	+	-	d	d	-	d	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	d	-	d	-
73	Peptostreptococcus micros	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
74	Peptococcus sacharolyticus	-	-	-	d	-	-	d	-	-	-	-	-	+	-	d	-	-	-	-	+	-	-
75	Peptococcus variabilis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
76	Peptococcus aerogenes	+	+	-	d	d	-	d	d	-	-	-	-	d	-	d	-	-	-	d	-	d	-
77	Peptostreptococcus micros	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	+	-	-

En los cuadros de identificación correspondientes al método API hemos marcado con un asterisco - aquellas cepas que no coincidan exactamente con el Manual de Holdeman y Moore empleado (64), haciendo las siguientes observaciones.

- Las cepas nº 2, 13, 14, 30, 32, 42, 85, 89, 111 pertenecientes a *Peptostreptococcus intermedius* no producen gas en medio de Rosenow, según el Manual todas las cepas producen gas abundante. Las cepas que a nosotros nos han producido gas (10, 19, 60, 78, 96) lo hacen en pequeña cantidad.

- La cepa nº 4 de *Peptostreptococcus intermedius* da reacción débil para la esculina, siendo siempre positiva en el Manual.

La celobiosa es negativa, siendo positiva en el Manual.

- La cepa nº 11, 12 de *Peptostreptococcus productus* da reacción negativa para la rafinosa, siendo siempre positiva en el Manual.

- La cepa nº 18 de *Peptostreptococcus parvulus* da una reacción débil para la glucosa y salicina, siendo reacción positiva para la primera y negativa para la segunda en el Manual.

- La cepa nº 26 de *Peptostreptococcus constellatus* da reacción negativa para la salicina siendo positiva siempre en el Manual.

- La cepa nº 36 de *Gaffkya anaerobia*, da reacción débil para el sorbitol, siendo siempre negativa en el Manual.

- Las cepas nº 58, 97 de *Gaffkya anaerobia* dan reacción positiva para el manitol siendo negativa en el Manual. El sorbitol da una reacción débil y en el Manual es negativa.

- La cepa nº 60 de *Peptostreptococcus intermedius* da una reacción débil para la celobiosa, siendo positiva en el Manual.

- Las cepas nº 68, 77 de *Peptostreptococcus micros* dan reacción positiva y débil respectivamente para

la trehalosa, siendo negativa la reacción del Manual.

- La cepa nº 79 de *Peptostreptococcus cons*
tellatus da reacción negativa para la salicina y trehalo
sa, siendo estas reacciones positivas en el Manual.

- La cepa nº 99 de *Gaffkya anaerobia* da -
reacción positiva para el manitol, siendo la reacción ne
gativa en el Manual.

- Las cepas nº 31,37,40,56,67,76, las hemos
identificado como *Peptococcus aerogenes*. Esta especie no
aparece en el Manual utilizado, pero presenta todas las -
características dadas en el *Bergey's Manual 8ª Edición* -
(42).

En general, las reacciones obtenidas por el
método API y las indicadas en el Manual para las distin -
tas especies de cocos anaerobios Gram (+) han coincidido.

En los casos indicados anteriormente en que
ha habido diferencias, estas no han sido en ningún momen -
to mayores de dos reacciones frente a las veintiuna estu -
diadas, por lo que la identificación de estas especies ha
sido posible.

II-2.-COMPARACION ENTRE LA IDENTIFICACION POR METODOS CONVENCIONALES Y "API 20 ANAEROBES" DE LOS COCOS ANAEROBIOS GRAM (+) AISLADOS.

A continuación se señalan las diferencias encontradas para cada especie entre los dos métodos citados.

ESPECIE	REACCION	no DE CEPAS	RESULTADOS CONVENCIONALES	RESULTADOS METODO "API"
Ps. intermedius	Celobiosa	2	d	+
		1	d	-
		3	+	d
	Manitol	1	-	d
		2	d	-
Ps. Productus	Xylosa	1	d	+
		1	+	d
	Celobiosa	1	d	+
	Manitol	1	-	d
		4	+	-
	Sorbitol	1	+	d
	Rhamnosa	1	+	d
1		+	-	
P. aerogenes	Gelatina	7	d	-
	Sacarosa	2	+	d
	Maltosa	2	+	d
Ps. micros	Glucosa	3	d	+
	Sacarosa	1	d	-
	Catalasa	1	d	+
P. sacharolyticus	Glucosa	2	+	d
		1	d	-
	Maltosa	1	-	d
1		-	d	
P. constellatus	Celobiosa	3	+	d
		2	-	+
P. variabilis	Gelatina	19	+	- ó d

En la tabla siguiente se han resumido estas diferencias indicando las encontradas para cada reacción y el porcentaje que las mismas presentan.

Reacción	DIFERENCIAS						COINCIDENCIAS	
	CON ⁺	CON ⁻	CON ^d	CON ^d	CON ⁺	CON ⁻	nº cepas	%
	API ⁻	API ⁺	API ⁺	API ⁻	API ^d	API ^d		
Indol	-	-	-	-	-	-	115	100,00
Glucosa	-	-	3	-	2	-	110	95,65
Manitol	4	-	-	2	-	2	107	93,04
Lactosa	-	-	-	-	-	-	115	100,00
Sacarosa	-	-	-	1	2	1	111	96,52
Maltosa	-	-	-	1	2	1	111	96,52
Xylosa	-	-	1	-	1	-	113	98,26
Gelatina	19	-	-	7	-	-	89	77,39
Celobiosa	-	2	3	1	6	-	103	89,57
Sorbitol	-	-	-	-	1	-	114	99,13
Rhamnosa	1	-	-	-	1	-	113	98,26
Catalasa	-	-	1	-	-	-	114	99,13
Valor medio	2,0	0,17	0,67	1,00	1,25	0,33	109,6	95,29

CON: M.concencional
API: M.API

+ = reacción positiva
- = reacción negativa
d = reacción débil

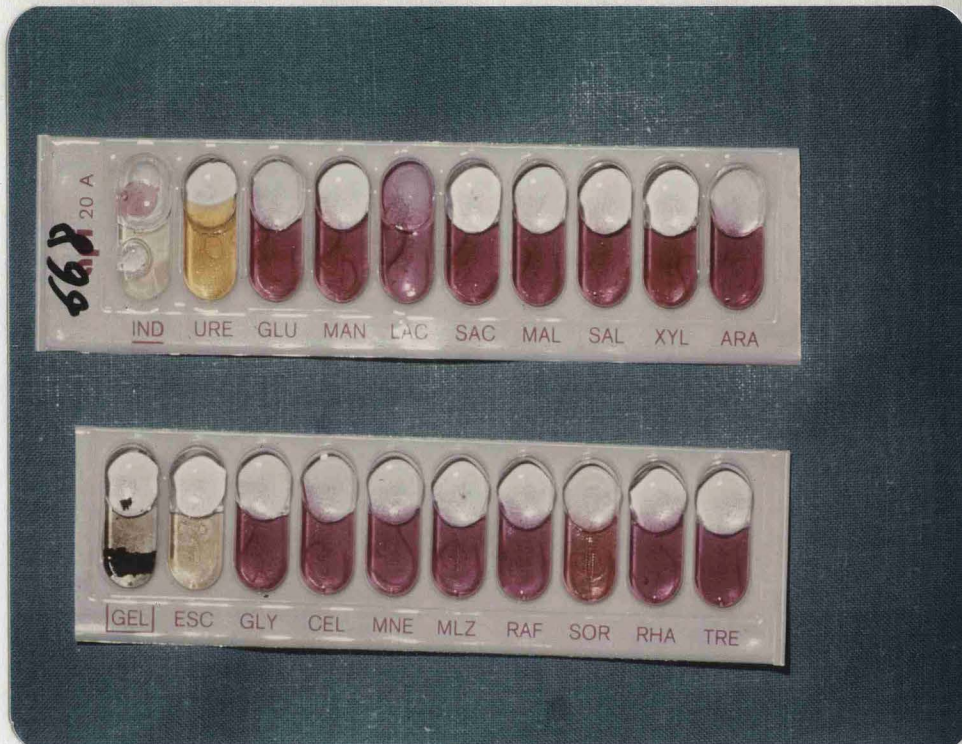
Hay que hacer notar que por el método API, no hemos obtenido resultados satisfactorios en la reac -
ción de la gelatina para *P. variabilis* y *P. aerogenes*, -
apareciendo únicamente una reacción débil transcurridas-
más de 48 horas en el 77,4 % de los casos, lo que está -
de acuerdo con la bibliografía revisada (Moore y col.75),
aunque el porcentaje de discrepancias obtenidas por nosotro
s es considerablemente más alto.

El test del indol nos ha coincidido en to-
dos los casos, a pesar de que las experiencias de hace -
aproximadamente dos años (Nord y col.,(76);Moore y col.,
75) indican resultados discrepantes para esta reacción ,
probablemente debido a que en el procedimiento API de -
aquellos momentos la anaerobiosis se obtenía con aceites
no minerales y no se llevaba a cabo la extracción del in
dol por xileno como se hace actualmente. Unos estudios -
posteriores realizados por Hansen y Stewart (77) ya seña
lan un 99,4 % de coincidencia para la prueba del indol ,
al comparar los dos métodos.

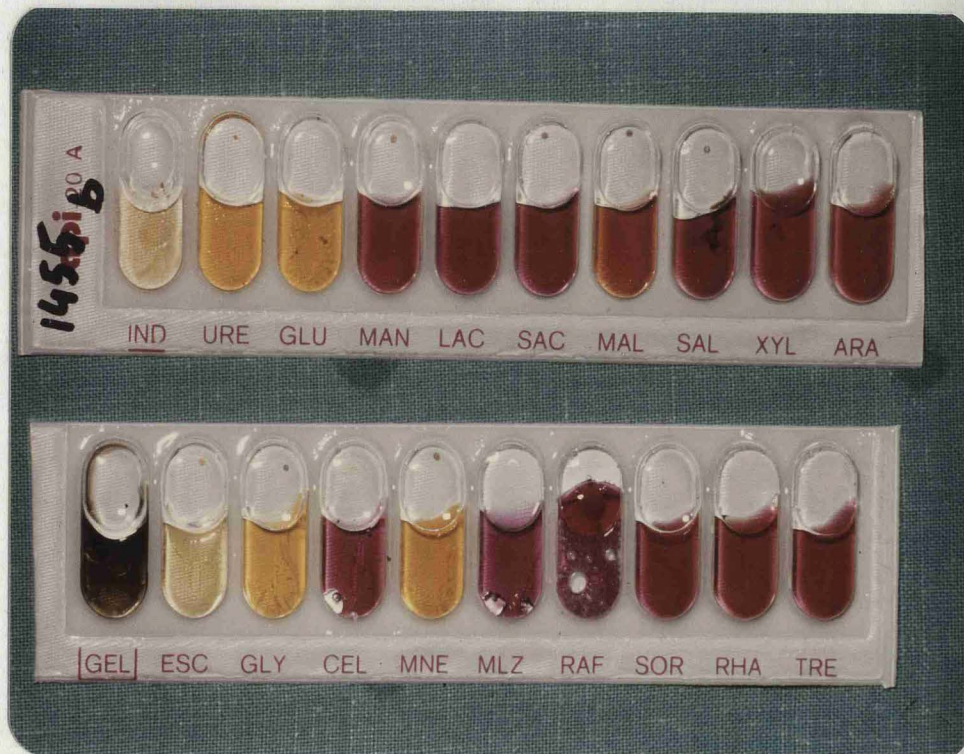
En la fermentación de azúcares los resultado
s han sido los siguientes: glucosa 95,7 % de coincidenci
a, manitol 93,0 %, sacarosa y maltosa 96,5 %, xylosa -

98,3 %, celobiosa 89,6 %, sorbitol 99,1 %, rhamnosa -
98,3 %. El resto de los azúcares ensayados ha coincidido en el 100 % de los casos.

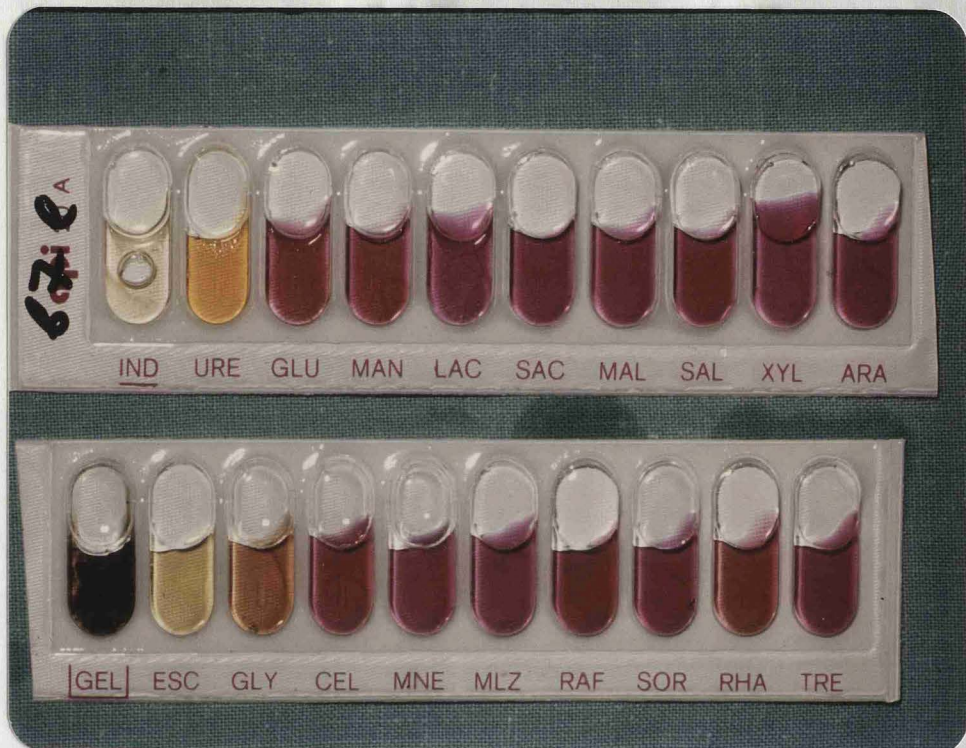
El valor medio de coincidencia ha sido del 95,29 % por lo que creemos que exceptuando la prueba de la gelatina como la menos concluyente, el método puede considerarse válido, como sistema de identificación rápida para aquellos laboratorios que no dispongan de muchos medios técnicos.



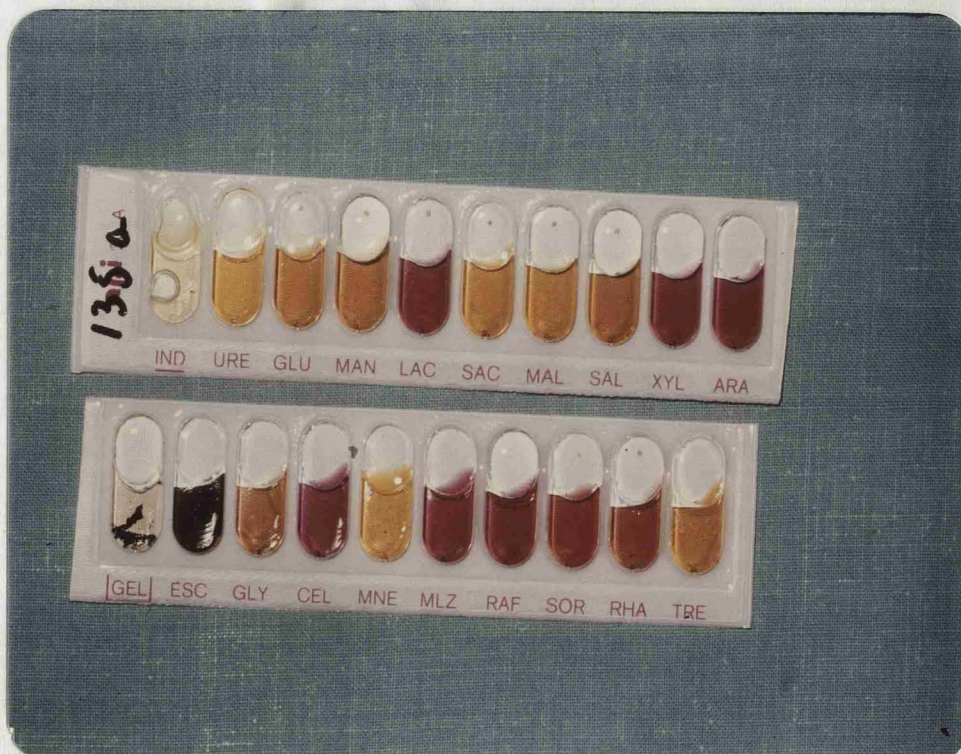
Identificación por el método API de *P. asacharolyticus*.



Identificación por el método API de *P. sacharolyticus*.

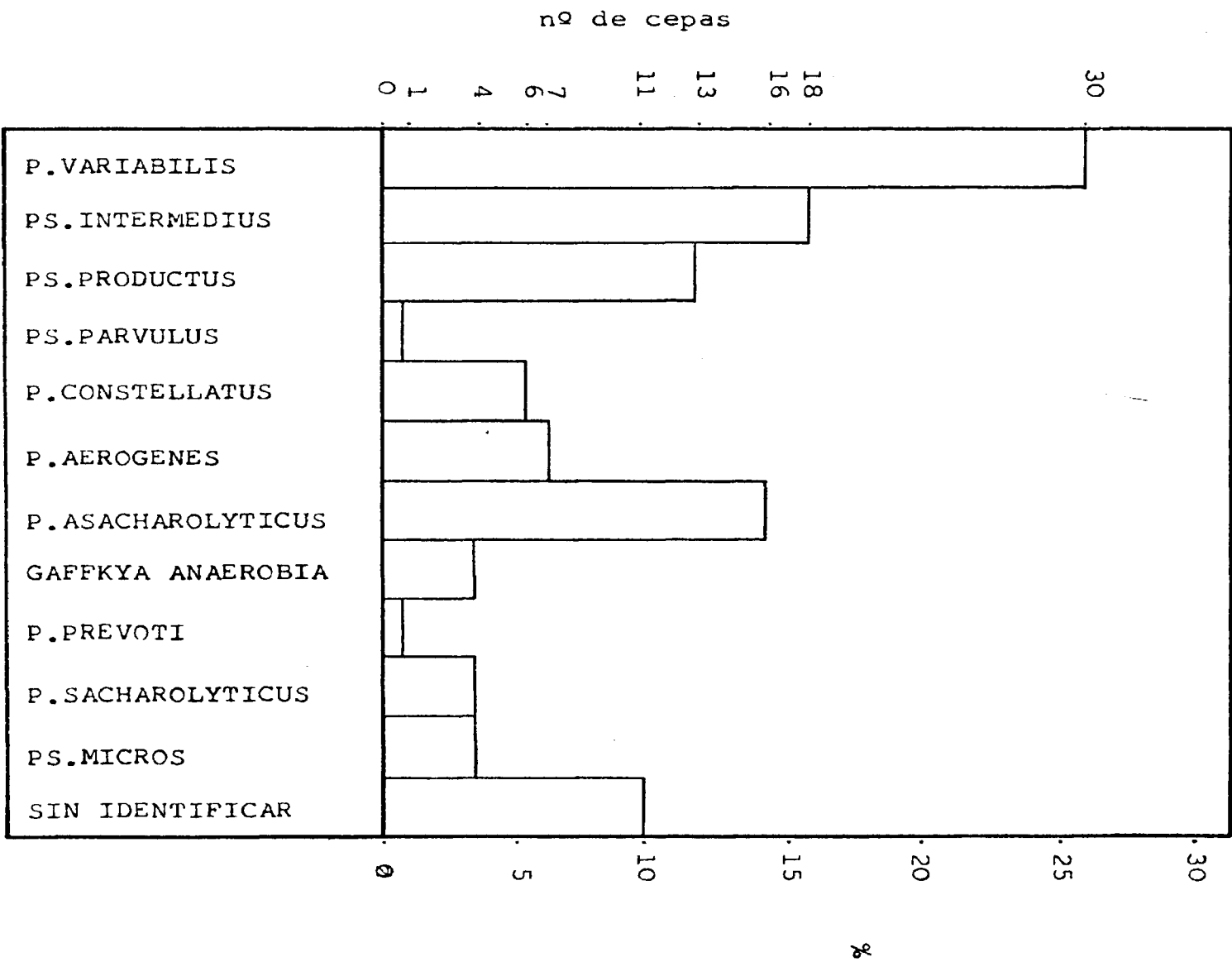


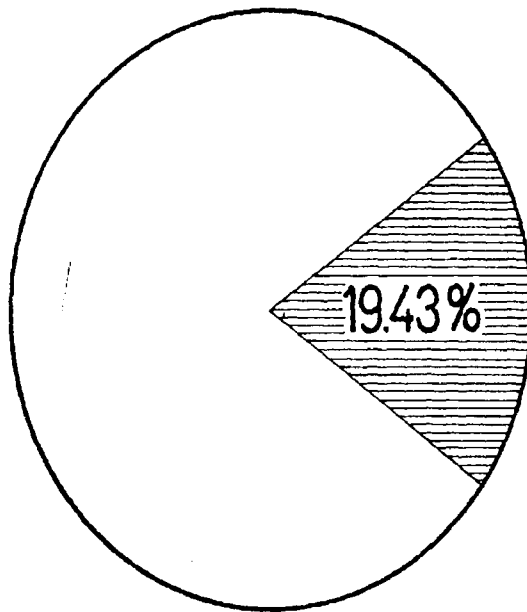
Identificación por el método API de
P. variabilis



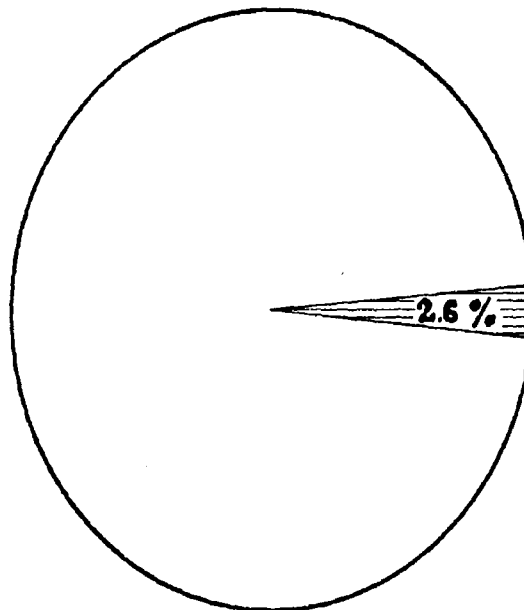
Identificación por el método API de
Gaffkya anaerobia

FRECUENCIA DE LAS ESPECIES DE COCOS ANAEROBIOS GRAM (+) AISLADOS





Frecuencia de cocos anaerobios Gram (+) en las muestras estudiadas.



Frecuencia de cepas estudiadas con más de una especie de co - cos anaerobios Gram (+).

II-3.- RELACION DE LAS CEPAS IDENTIFICADAS Y SU ORIGEN

Una vez identificadas las distintas especies de cocos Gram (+) aisladas, hemos estudiado la correspondencia de las mismas con su origen específico, la cual puede observarse en la siguiente tabla:

nº de cepa	Especie	Origen
1	<i>P. variabilis</i>	Herida
2	<i>P. intermedius</i>	Muelas cariadas
3	<i>P. variabilis</i>	Muelas cariadas
4	<i>Ps. intermedius</i>	Aspiración trans-traqueal
5b	<i>Ps. productus</i>	Muelas cariadas
5c	<i>Ps. variabilis</i>	Muelas cariadas
6	<i>P. variabilis</i>	Muelas cariadas
7	<i>P. variabilis</i>	Muelas cariadas
8	<i>Ps. productus</i>	Muelas cariadas
9	<i>P. variabilis</i>	Muelas cariadas

nº de cepa	Especie	Origen
10	Ps. intermedius	Muelas cariadas
11	Ps. productus	Muelas cariadas
12d	Ps. productus	Muelas cariadas
12f	Ps. intermedius	Muelas cariadas
13	Ps. intermedius	Muelas cariadas
14	Ps. intermedius	Muelas cariadas
15	Ps. intermedius	Muelas cariadas
16	P. variabilis	Muelas cariadas
17	P. variabilis	Muelas cariadas
18	Ps. parvulus	Muelas cariadas
19	Ps. intermedius	Muelas cariadas
20	P. variabilis	Muelas cariadas
21	P. variabilis	Muelas cariadas
22	Sin identificar	Muelas cariadas
23	P. variabilis	Muelas cariadas
24	P. variabilis	Muelas cariadas
25	Ps. productus	Muelas cariadas
26	Ps. productus	Muelas cariadas
27	P. variabilis	Muelas cariadas
28	Sin identificar	Muelas cariadas

nº de cepa	Especies	Origen
29	<i>P. constellatus</i>	Pus
30	<i>Ps. intermedius</i>	Muelas cariadas
31	<i>P. aerogenes</i>	Herida
32	<i>Ps. intermedius</i>	Muelas cariadas
33	<i>P. variabilis</i>	Muelas cariadas
34	<i>P. asacharolyticus</i>	Hematoma
35	<i>Ps. productus</i>	Herida
36	<i>Gaffkya anaerobia</i>	Abceso de cara
37	<i>P. aerogenes</i>	Herida
38	<i>P. asacharolyticus</i>	Punto de sutura
39	<i>P. prevoti</i>	Herida
40	<i>P. aerogenes</i>	Herida
41	Sin identificar	Herida
42	<i>Ps. intermedius</i>	Herida postoperatoria
43	Sin identificar	Herida
44	<i>Ps. productus</i>	Herida
45	<i>P. variabilis</i>	Herida
46	<i>P. variabilis</i>	Pus
47	<i>P. variabilis</i>	Exudado pleural
48	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida pierna

nº de cepa	Especies	Origen
49	<i>P. variabilis</i>	Absceso perinefrítico
50	<i>P. variabilis</i>	Absceso renal
51	<i>P. variabilis</i>	Absceso
52	<i>P. variabilis</i>	Absceso de pared
53	<i>P. variabilis</i>	Pus
54	<i>Ps. productus</i>	Herida
55	Sin identificar	Pus
56	<i>P. aerogenes</i>	Herida postoperatoria
57	<i>P. asacharolyticus</i>	Pus
58	<i>Gaffkya anaerobia</i>	Herida
59	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida
60	<i>Ps. intermedius</i>	Herida
61	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida
62	<i>P. sacharolyticus</i>	Absceso inguinal
63	<i>Ps. productus</i>	Herida
64	Sin identificar	Herida
65	Sin identificar	Aspiración trans-traqueal
66	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida postoperatoria
67	<i>P. aerogenes</i>	Pus
68	<i>Ps. micros</i>	Absceso de pared

nº de cepa	Especies	Origen
69	<i>P. sacharolyticus</i>	Abceso
70	<i>P. asacharolyticus</i>	Pus
71	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida peritoneal
72	<i>P. aerogenes</i>	Pus
73	<i>Ps. micros</i>	Abceso de pared
74	<i>P. sacharolyticus</i>	Abceso
75	<i>P. variabilis</i>	Pus
76	<i>P. aerogenes</i>	Pus
77	<i>Ps. micros</i>	Herida quirúrgica
78	<i>Ps. intermedius</i>	Herida
79	<i>P. constellatus</i>	Herida postoperatoria
80	<i>P. variabilis</i>	Herida postoperatoria
81	<i>Ps. productus</i>	Herida postoperatoria
82	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida abdomen
83	<i>P. asacharolyticus</i>	Pus
84	Sin identificar	LCR
85	<i>Ps. intermedius</i>	Herida torácica
86	<i>P. variabilis</i>	Herida articular
87	<i>P. variabilis</i>	Herida
88	<i>P. variabilis</i>	Herida postoperatoria

nº de cepa	Especies	Origen
89	<i>Ps. intermedius</i>	Herida
90	<i>P. constellatus</i>	Absceso
91	Sin identificar	Herida rodilla
92	<i>P. constellatus</i>	Exudado pleural
93	<i>P. constellatus</i>	Herida abdominal
94	<i>P. constellatus</i>	Absceso
95	<i>P. variabilis</i>	Herida amputación
96	<i>Ps. intermedius</i>	Herida
97	<i>Gaffkya anaerobia</i>	Herida
98	<i>Ps. intermedius</i>	Absceso
99	<i>Gaffkya anaerobia</i>	Herida operatoria
100	<i>Ps. productus</i>	Herida
101	<i>Ps. micros</i>	Absceso
101b	<i>P. sacharolyticus</i>	Absceso
102	<i>Ps. productus</i>	Herida
103	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida
104	<i>P. asacharolyticus</i>	Pus
105	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida
106	<i>P. asacharolyticus</i>	Herida

nº de cepa	Especies	Origen
107	<i>P. variabilis</i>	Herida postoperatoria
108	Sin identificar	Herida
109	Sin identificar	Pus
110	<i>P. variabilis</i>	Aspiración trans-traqueal
111	<i>Ps. intermedius</i>	Aspiración trans-traqueal
112	<i>P. asacharolyticus</i>	Aspiración trans-traqueal

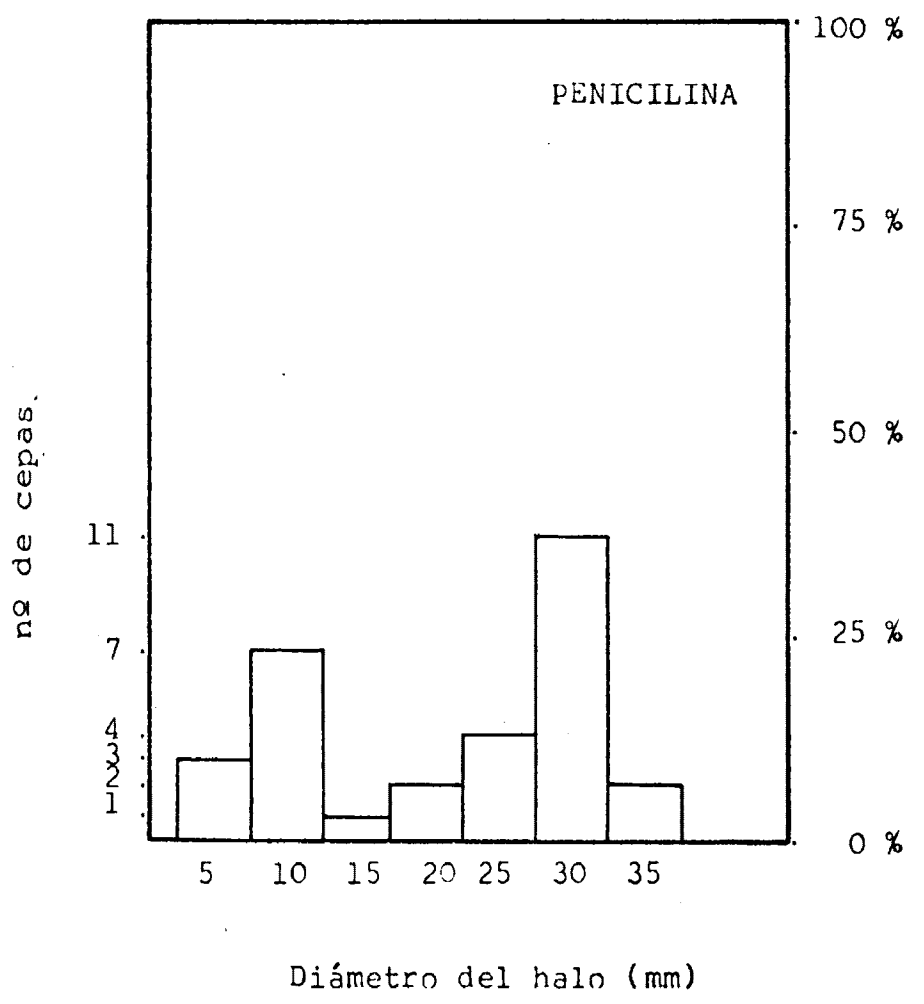
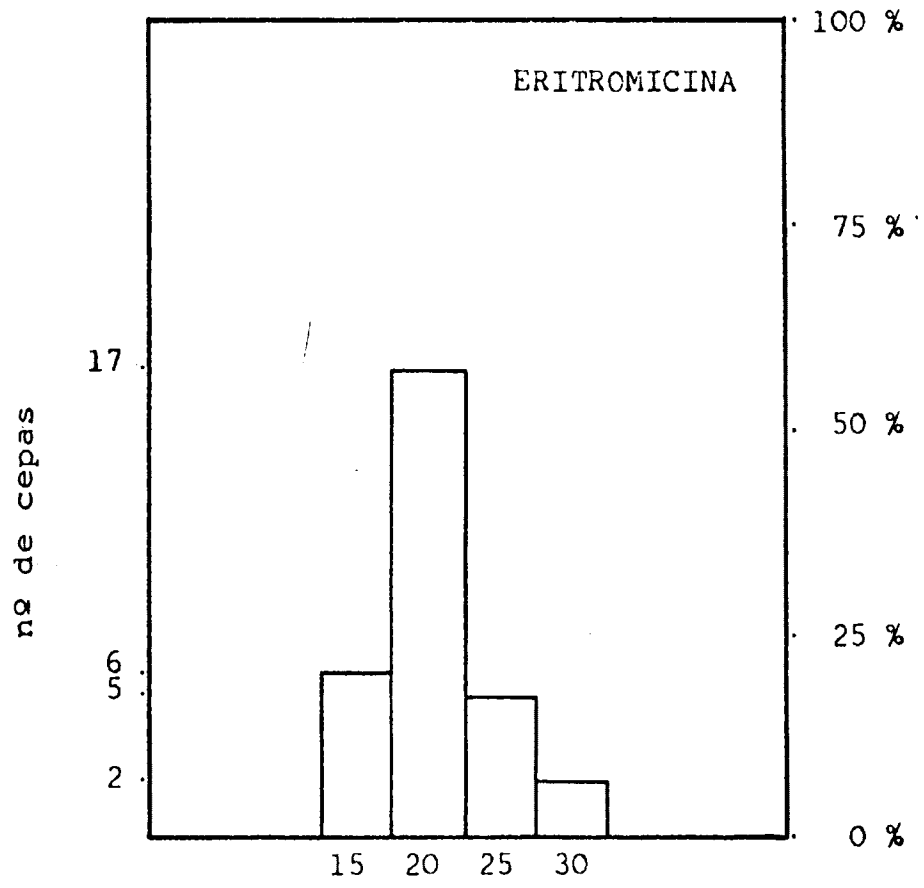
ORIGEN		ESPECIE											TOTAL	PORCENTAJES	
		P. variabilis	P. asacharolyticus	P. prevoti	P. sacharolyticus	P. constellatus	P. aerogenes	Ps. intermedius	Ps. productus	Ps. micros	Ps. parvulus	Gaffkya anaerobia			Sin identificar
Muelas cariadas		13	-	-	-	-	-	9	6	-	1	-	2	31	27
Heridas		8	9	1	-	2	4	6	7	1	-	3	5	46	40
Abscesos		4	-	-	4	2	-	1	-	3	-	1	-	15	13
Pus		3	4	-	-	1	3	-	-	-	-	-	2	13	11
Aspiración trans-traqueal		1	1	-	-	-	-	2	-	-	-	-	1	5	4
Otros orígenes	Hematoma	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	Punto de sutura	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
	Exudado pleural	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2	2
	L.C.R.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	1
TOTAL		30	16	1	4	6	7	18	13	4	1	4	11	115	100
PORCENTAJES		26	14	1	3	5	6	16	11	3	1	3	10	100	

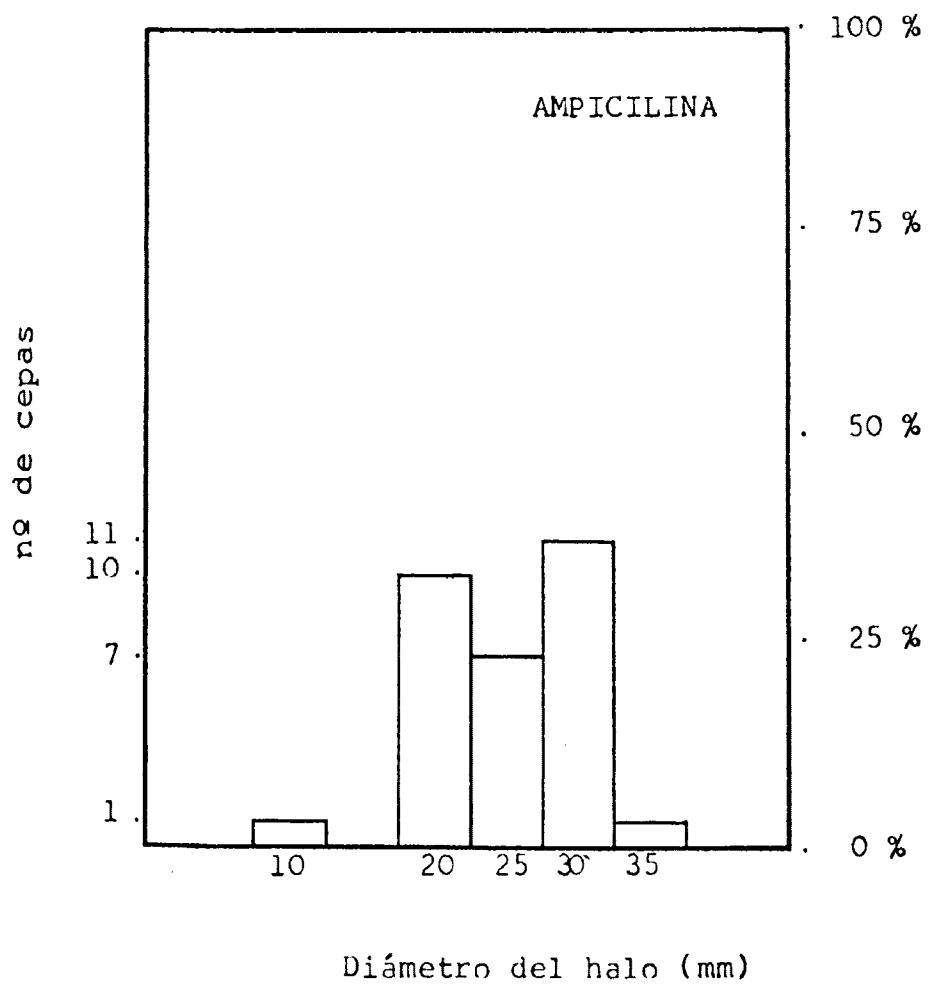
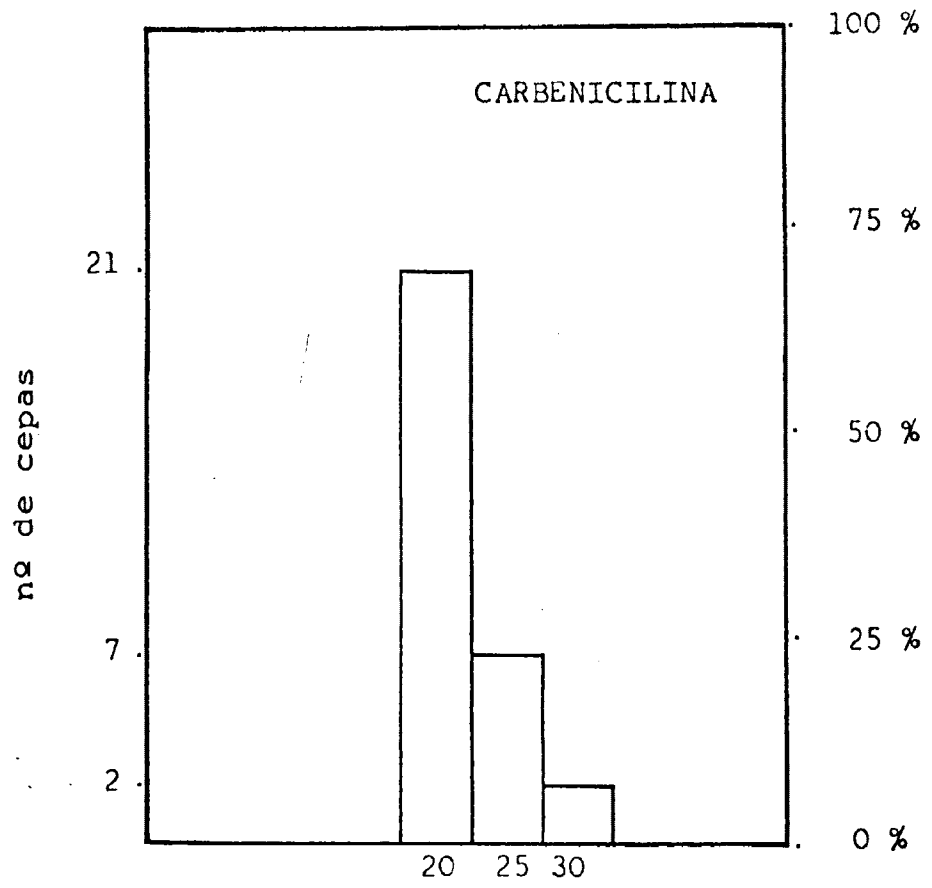
III.4.- SENSIBILIDAD DE LAS CEPAS AISLADAS A LOS ANTIBIOTICOS.

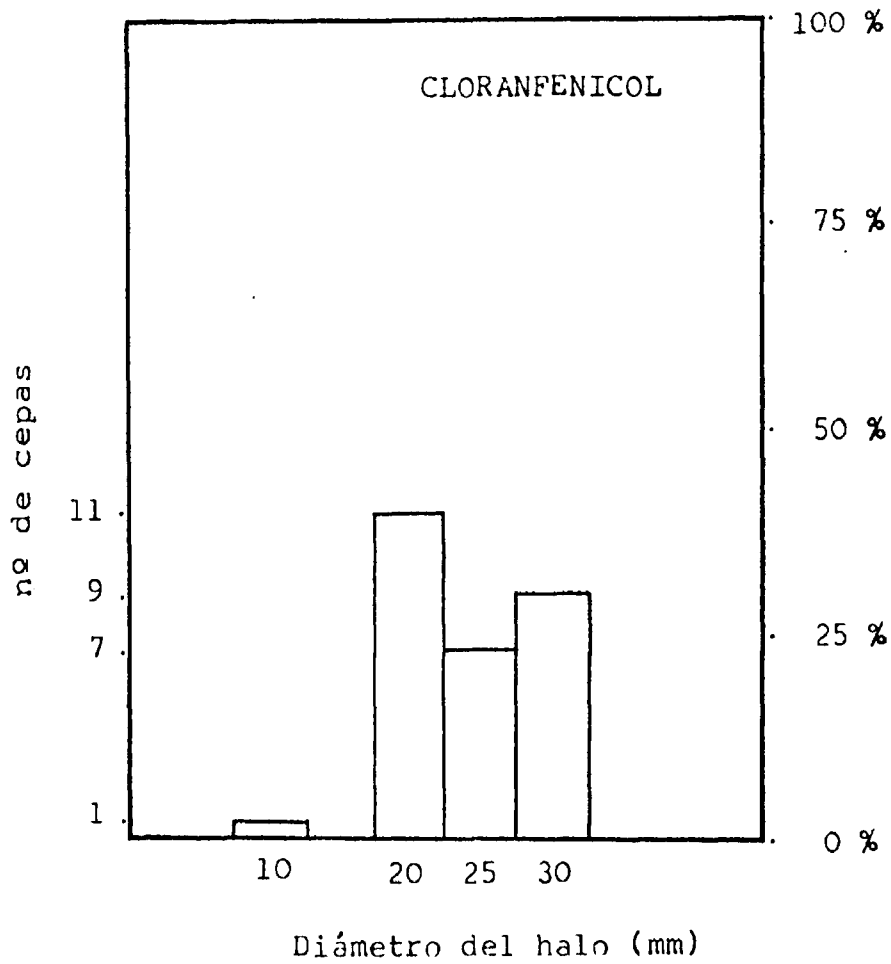
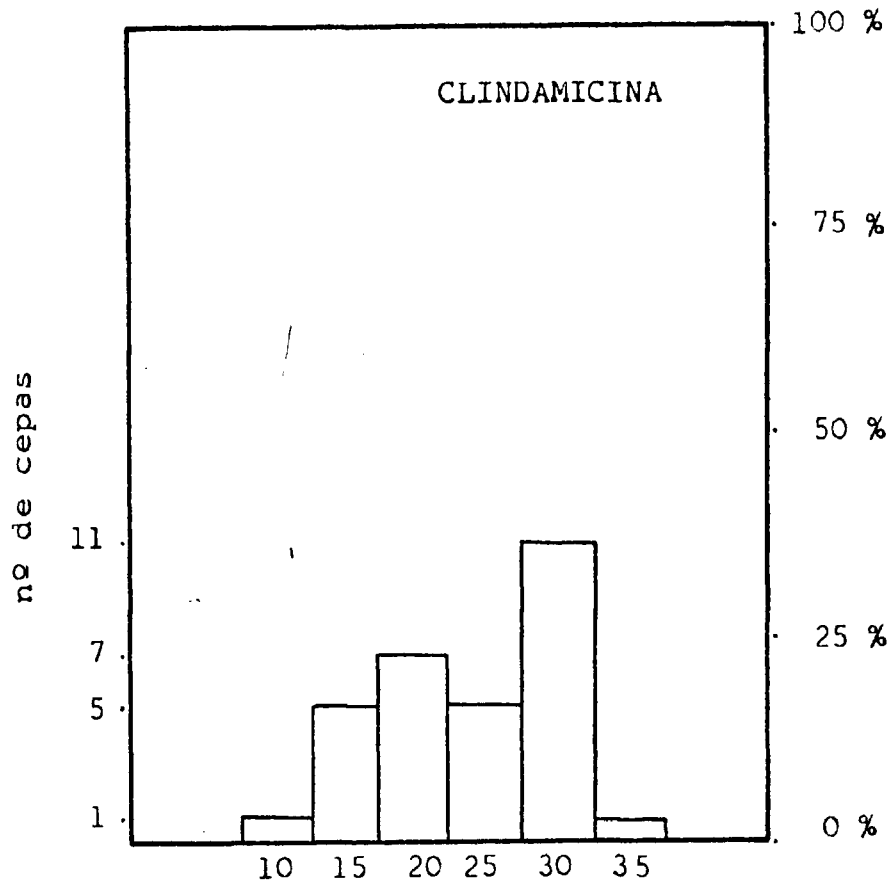
La sensibilidad de las cepas aisladas a los ocho antibióticos estudiados se ha presentado en histogramas para las especies con más de diez cepas, en ordenadas se dan porcentajes y número de cepas, en abcisas el diámetro del halo.

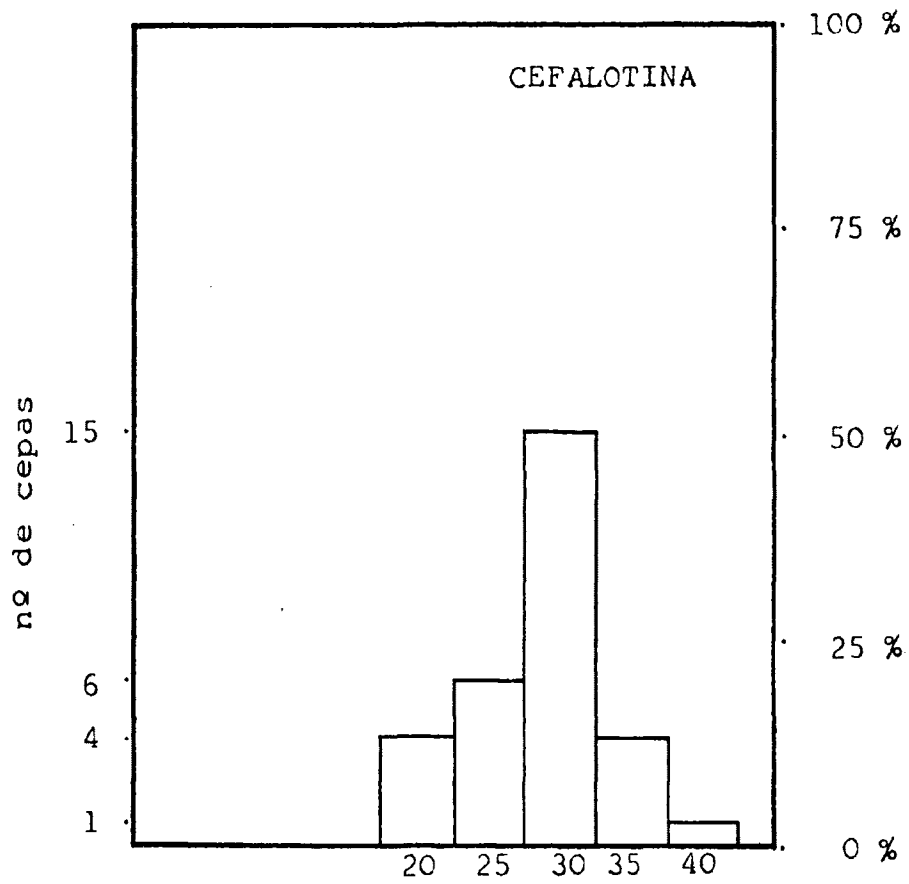
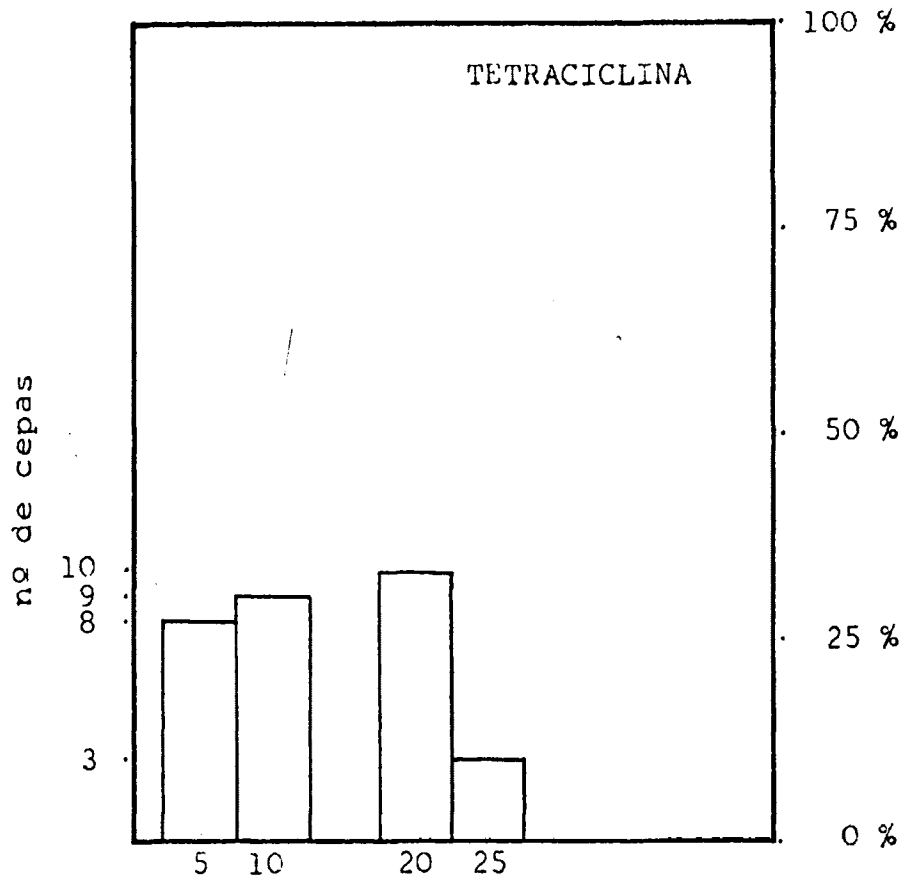
Cuando el número de cepas es inferior a diez- el histograma no sería representativo, por lo que presentamos el diámetro del halo en un cuadro de doble entrada, poniendo en verticales el número de cepas y enhorizontales los antibióticos estudiados.

A continuación se han representado las curvas de sensibilidad de las cepas aisladas a los antibióticos estudiados, sin tener en cuenta las especies.

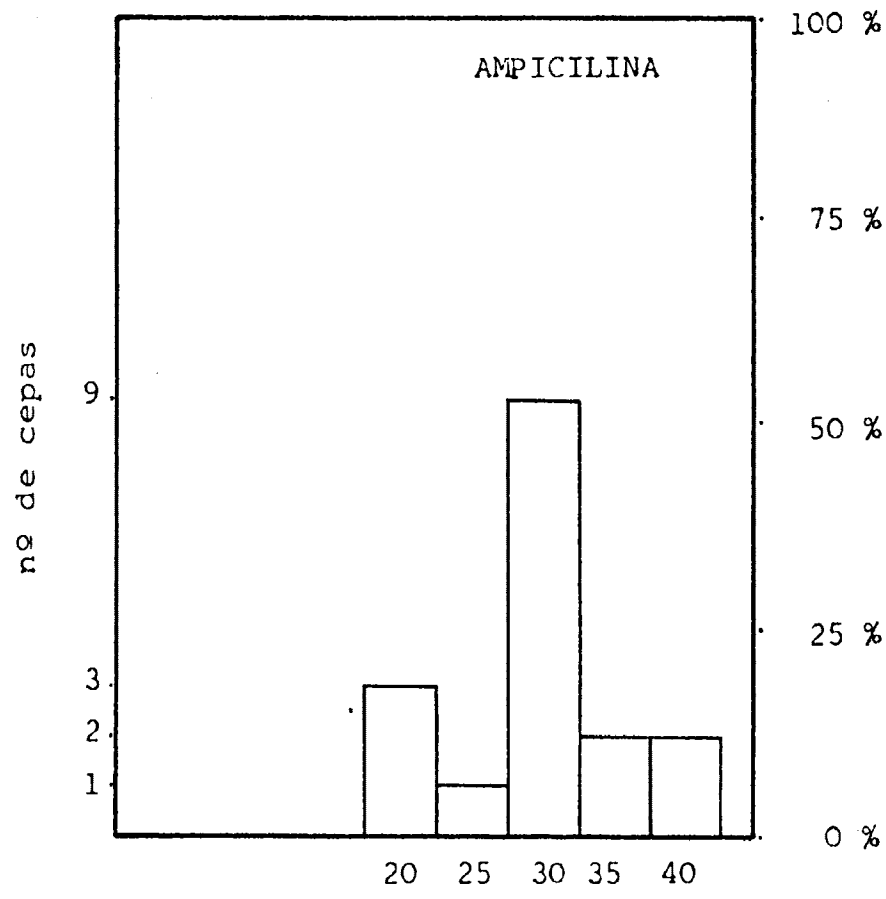
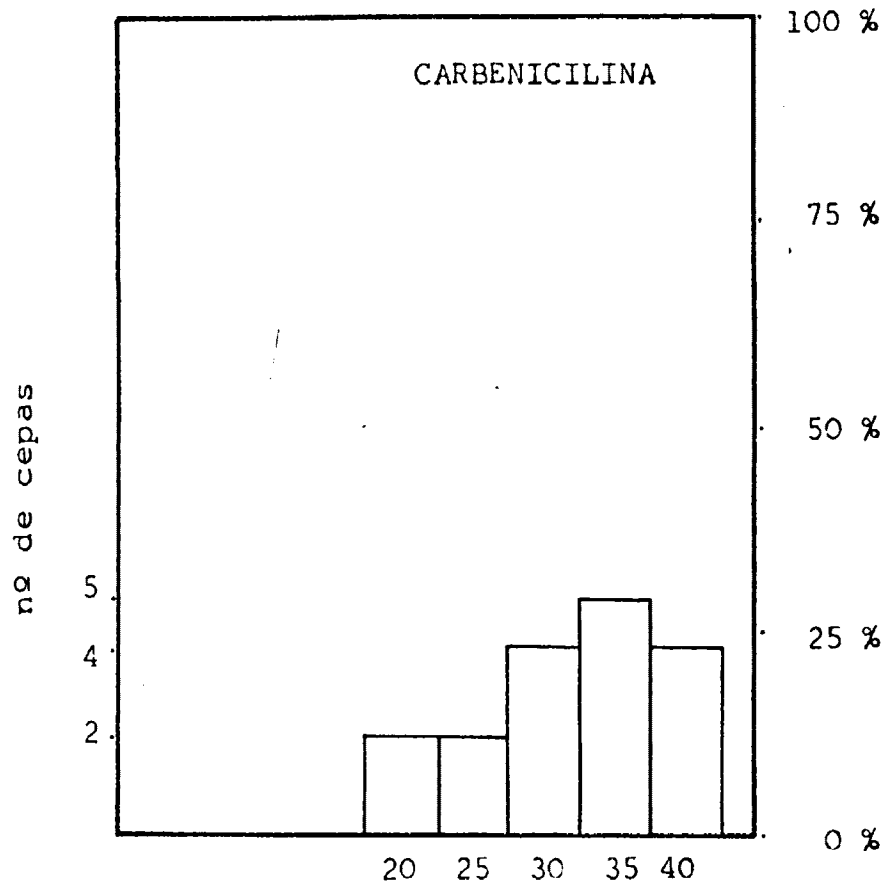




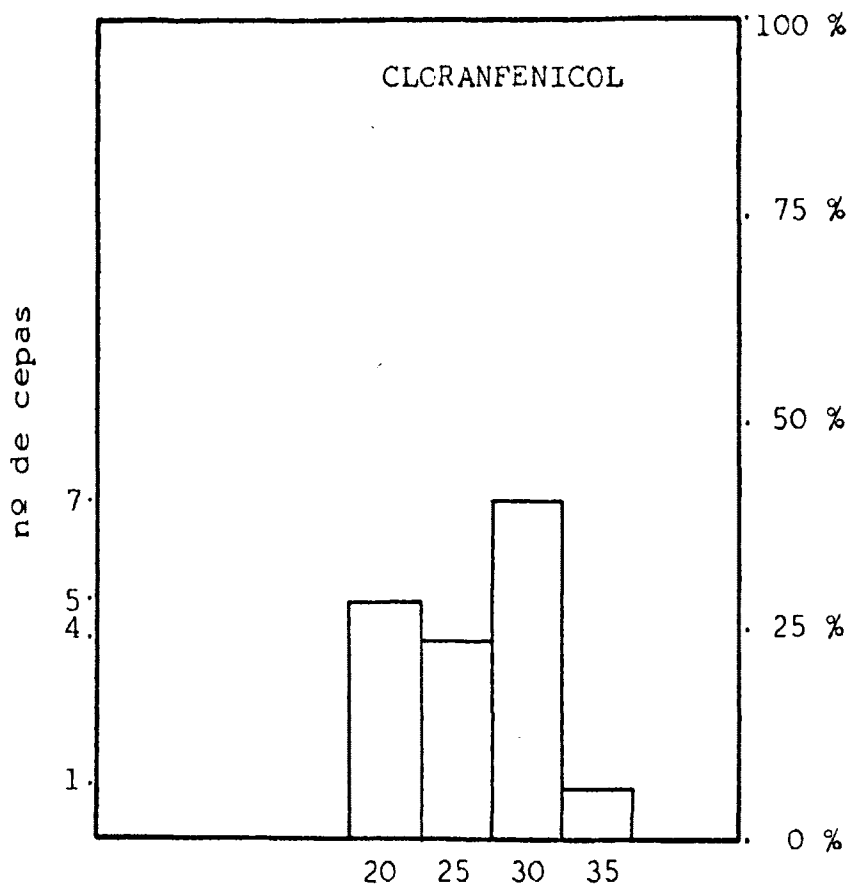
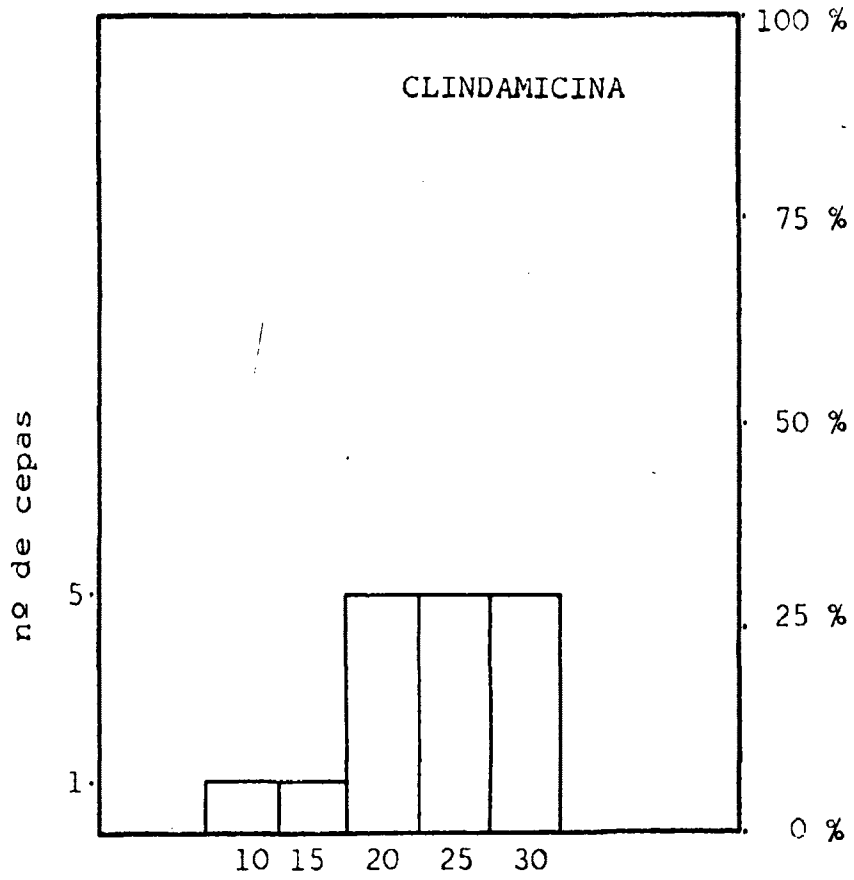




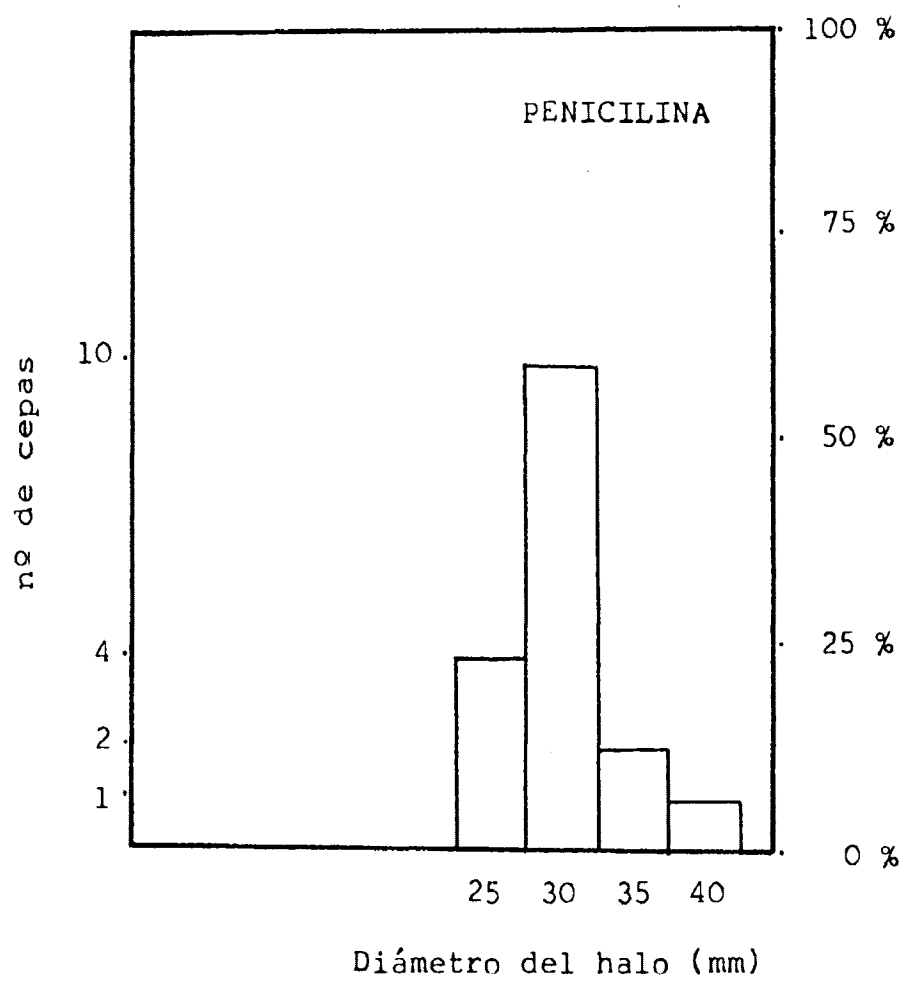
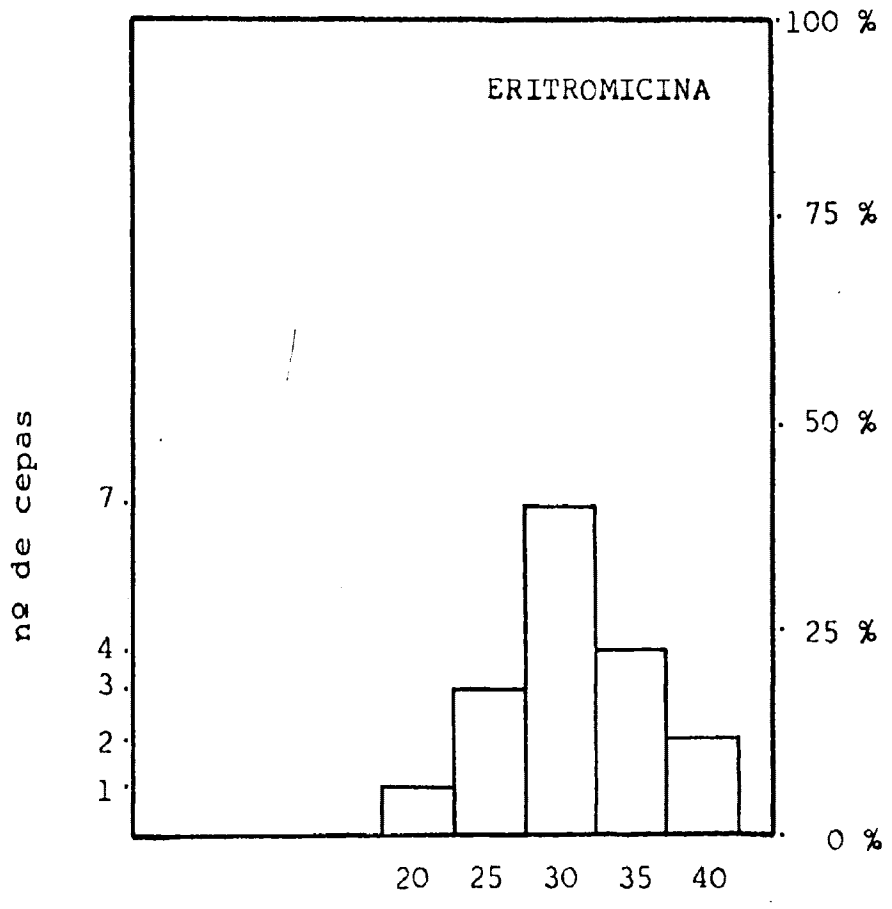
Diámetro del halo (mm)

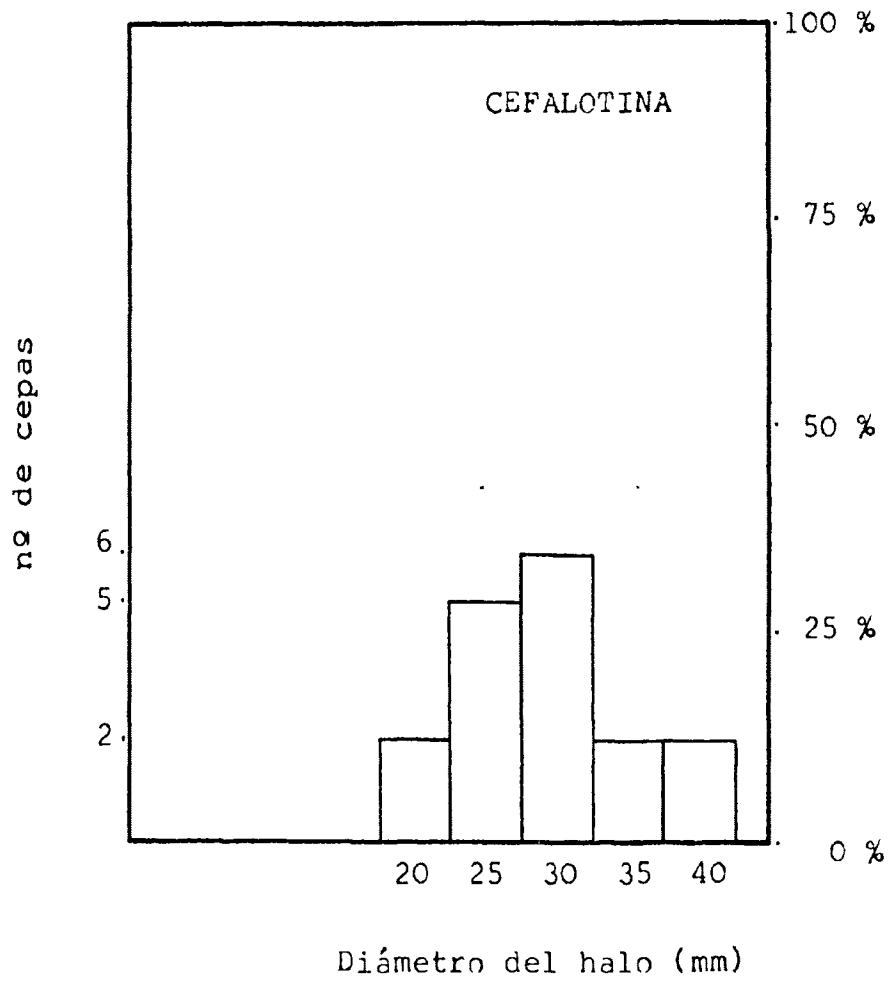
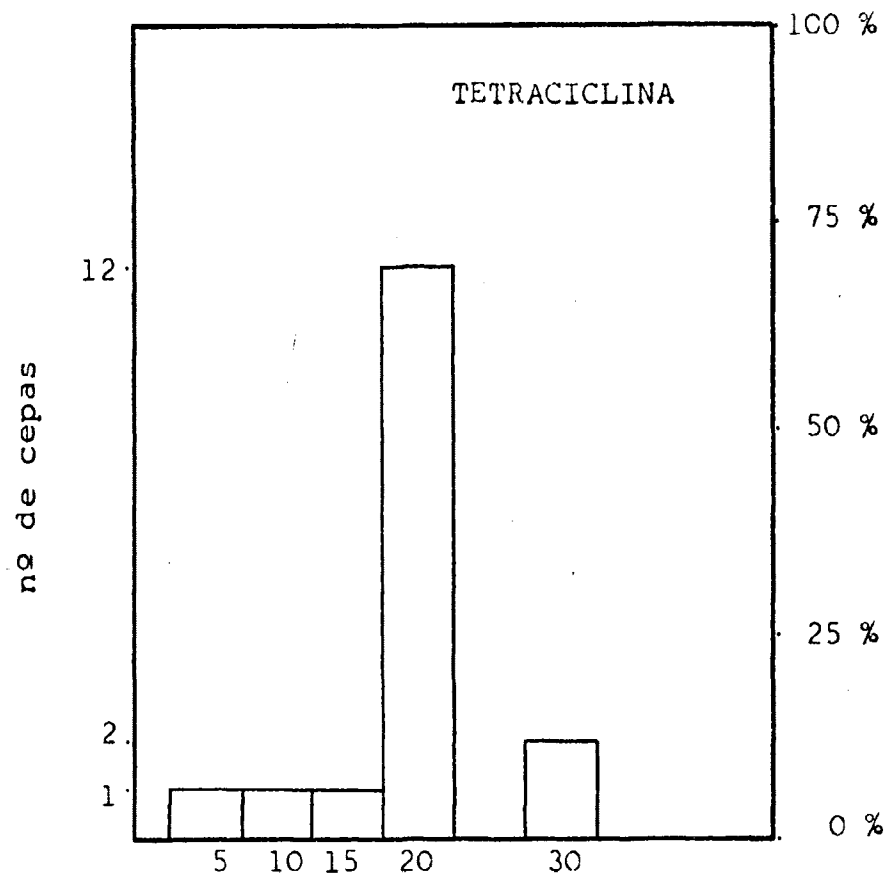


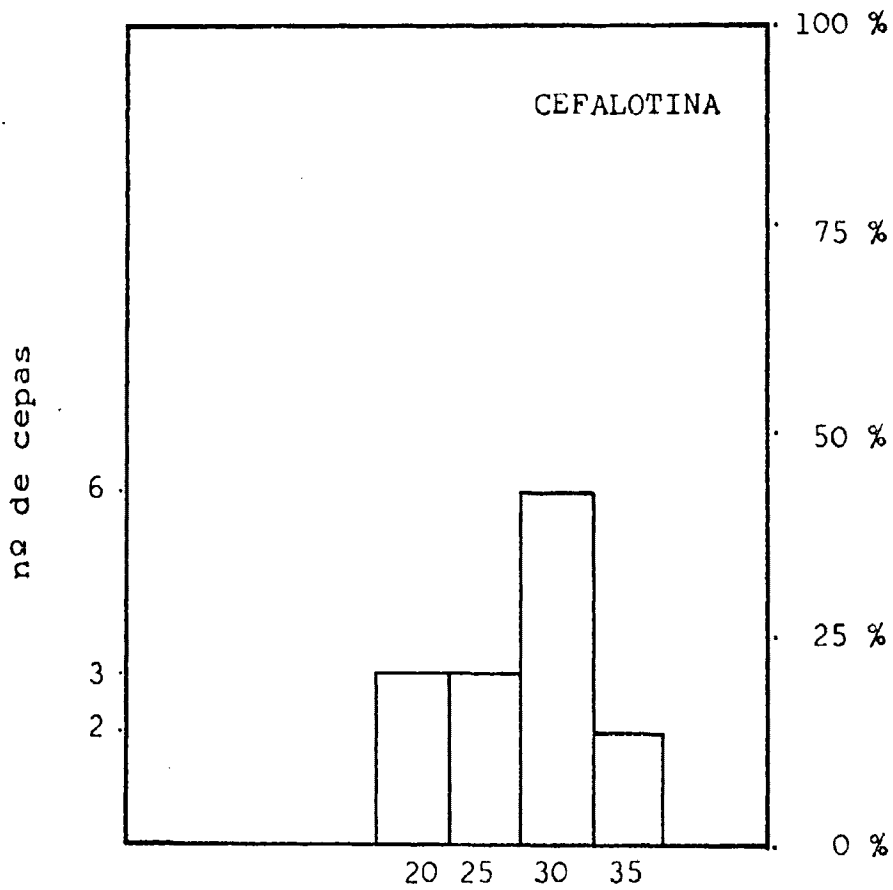
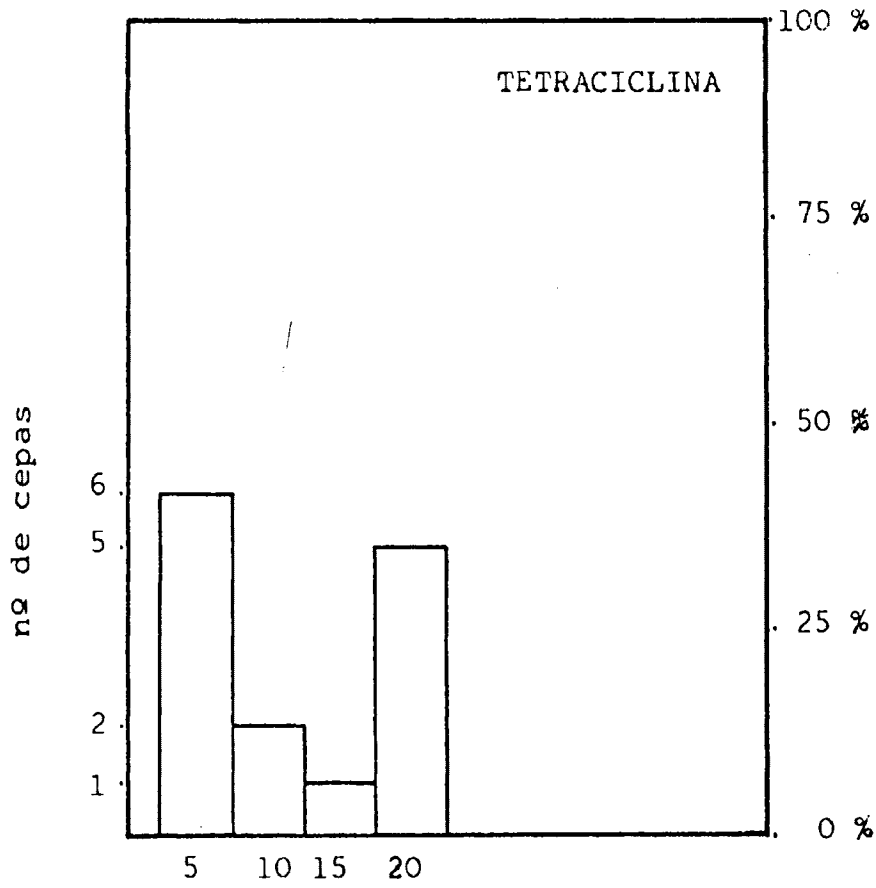
Diámetro del halo (mm)



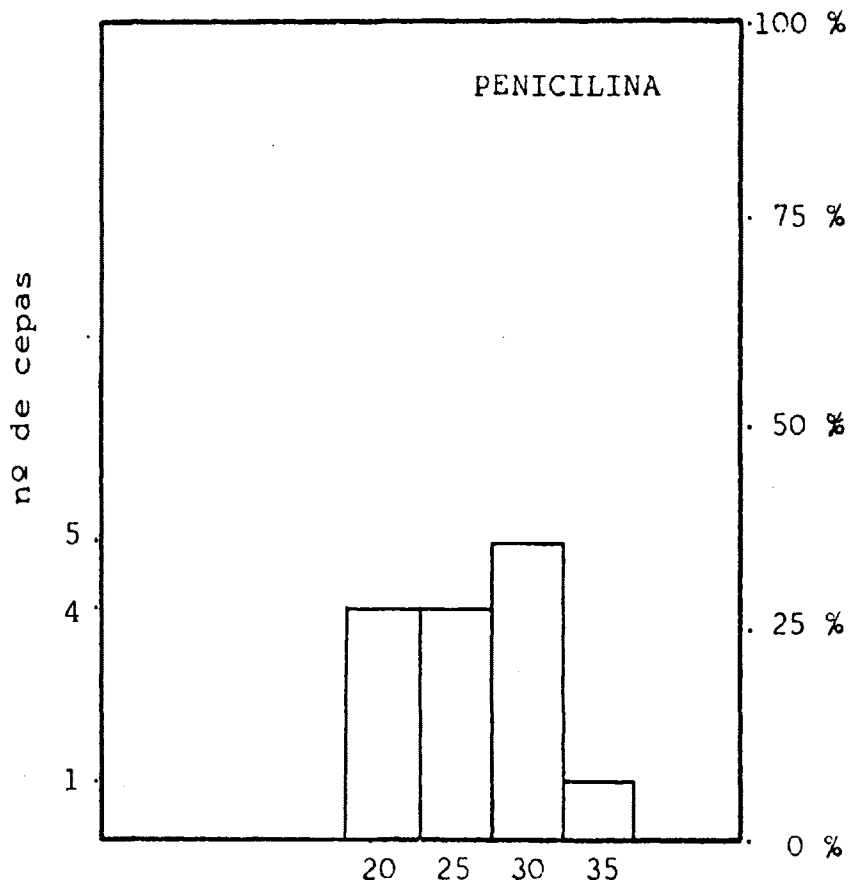
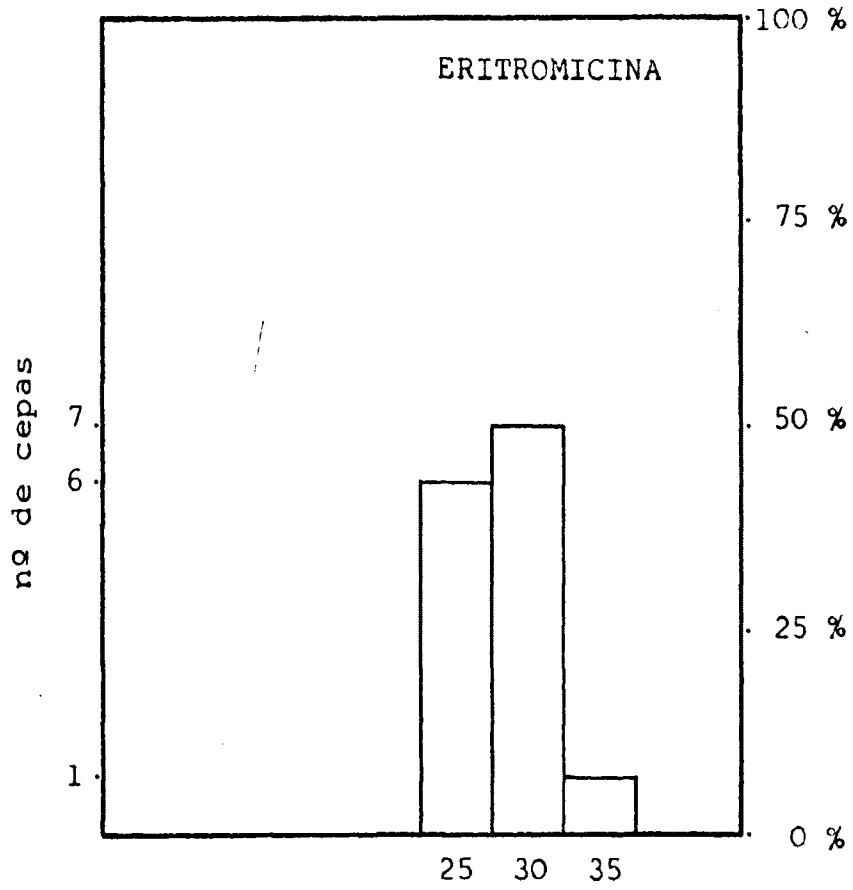
Diámetro del halo (mm)



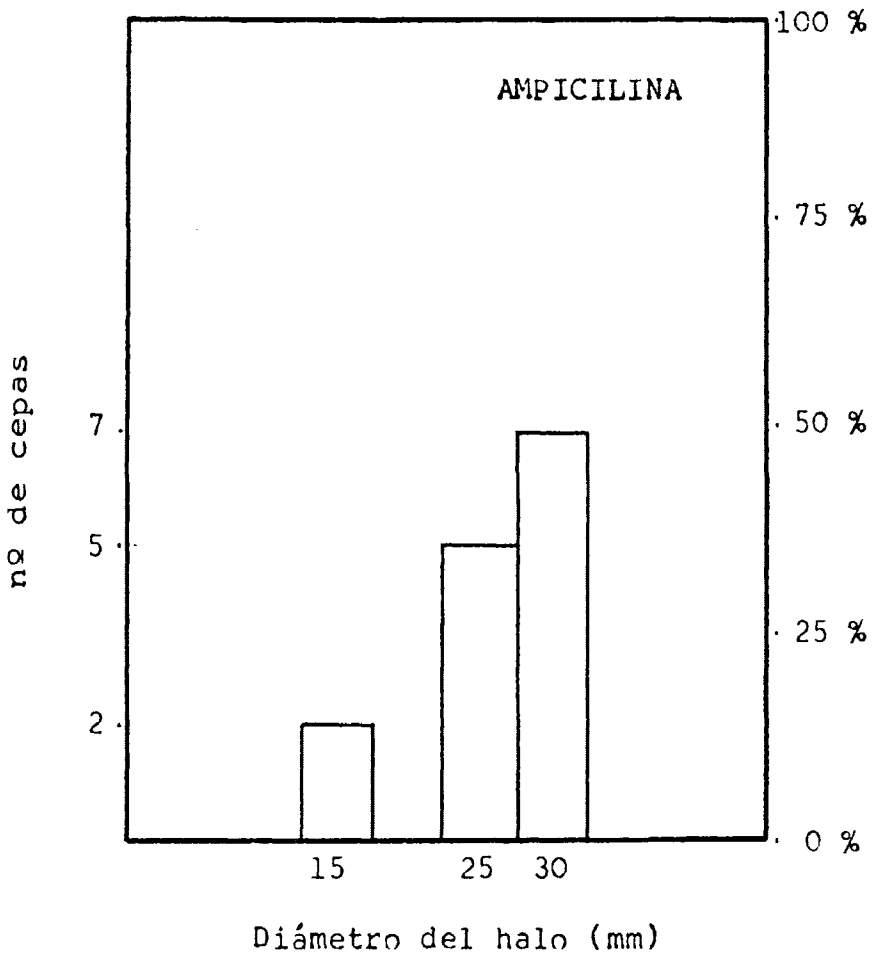
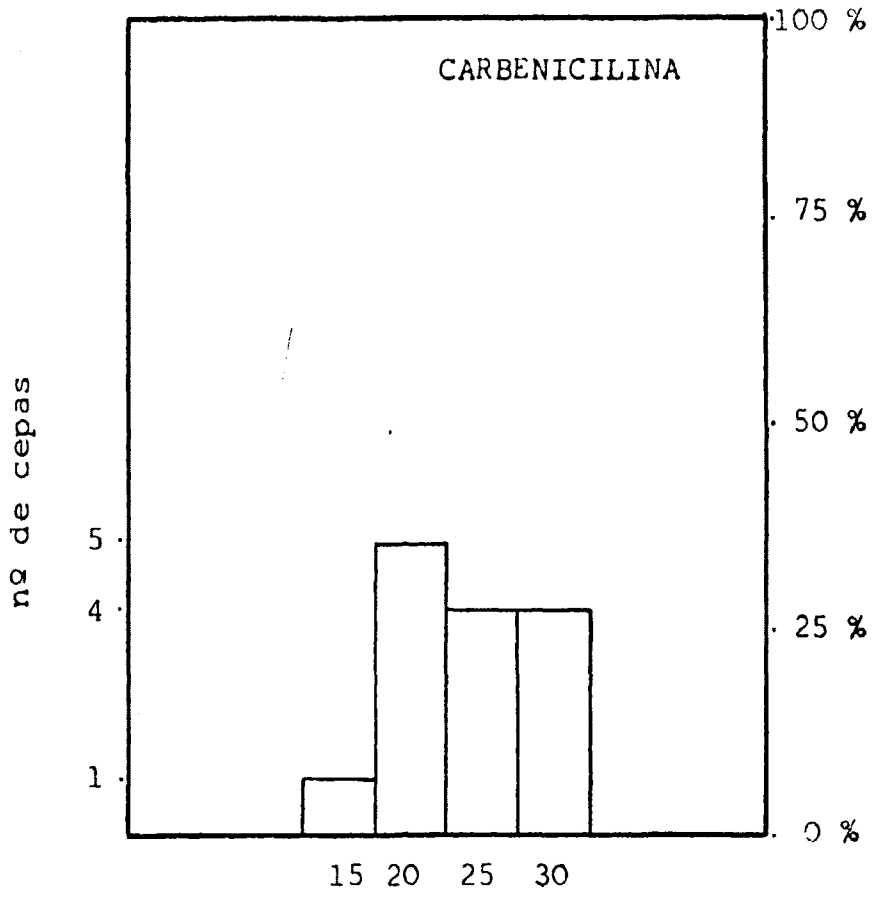


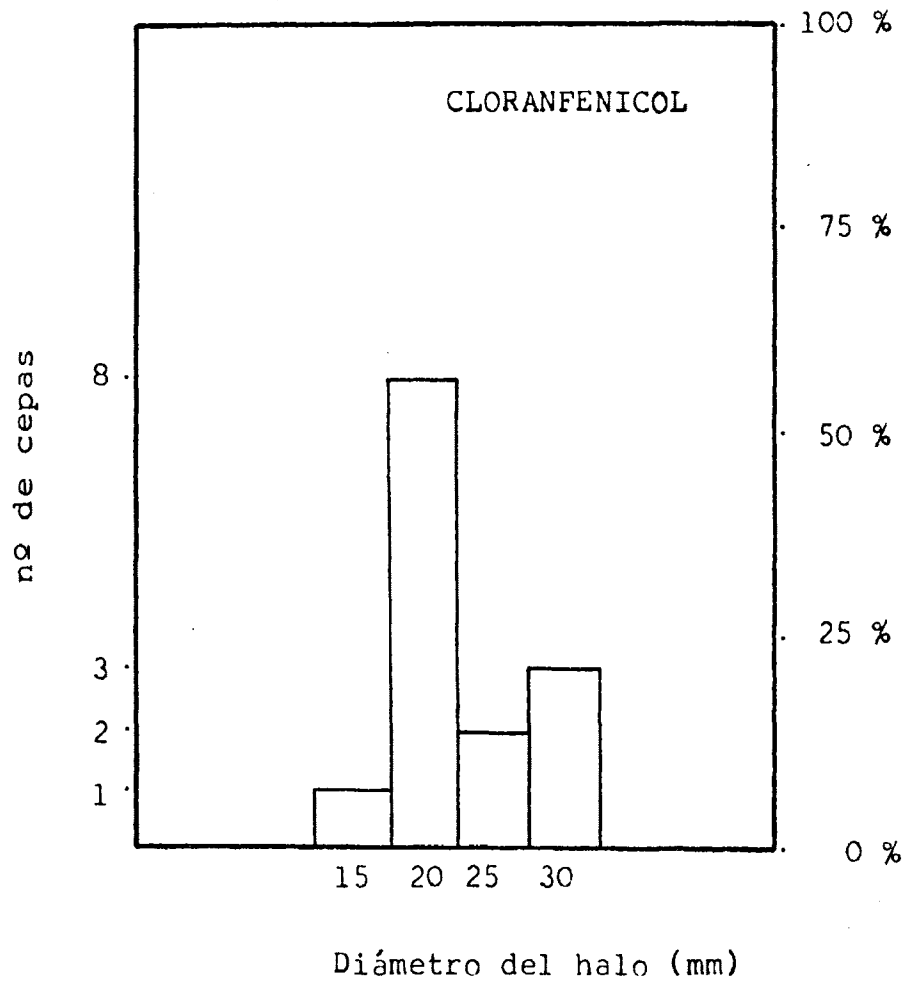
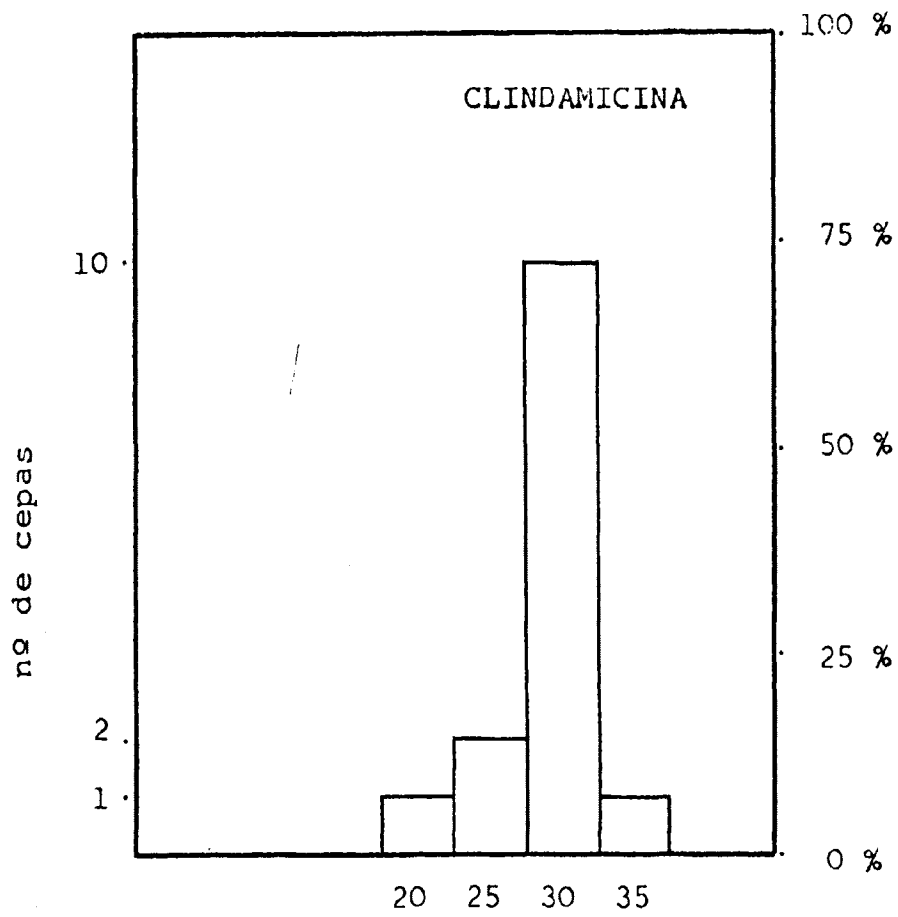


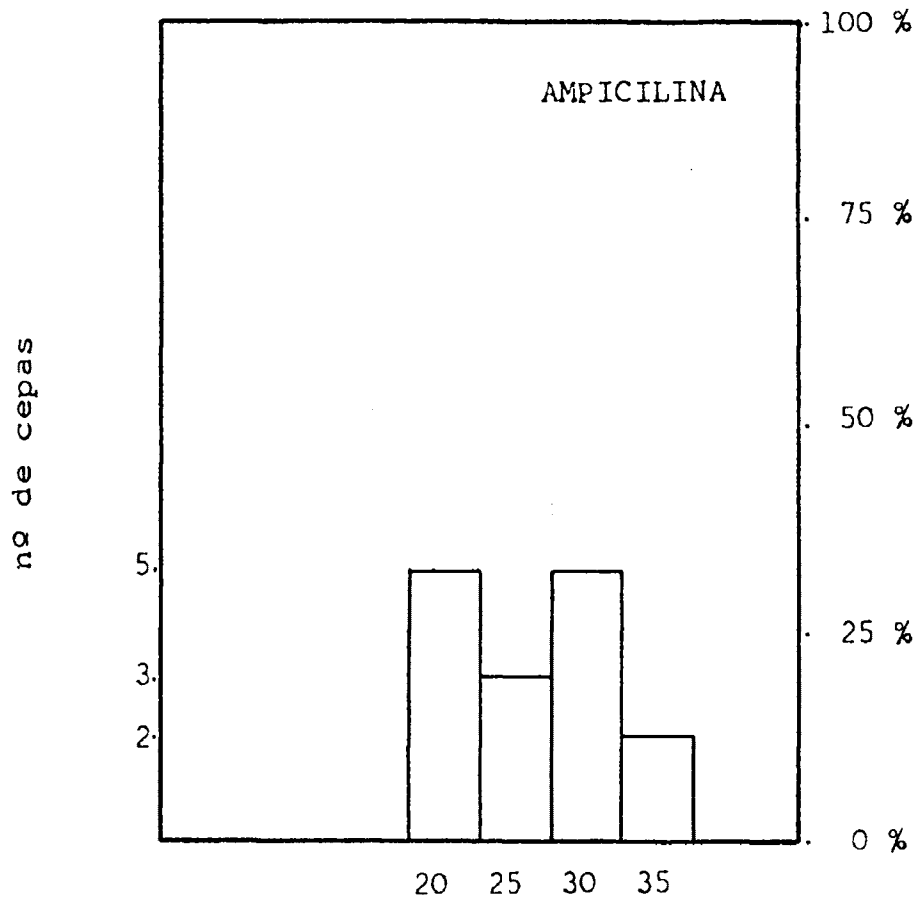
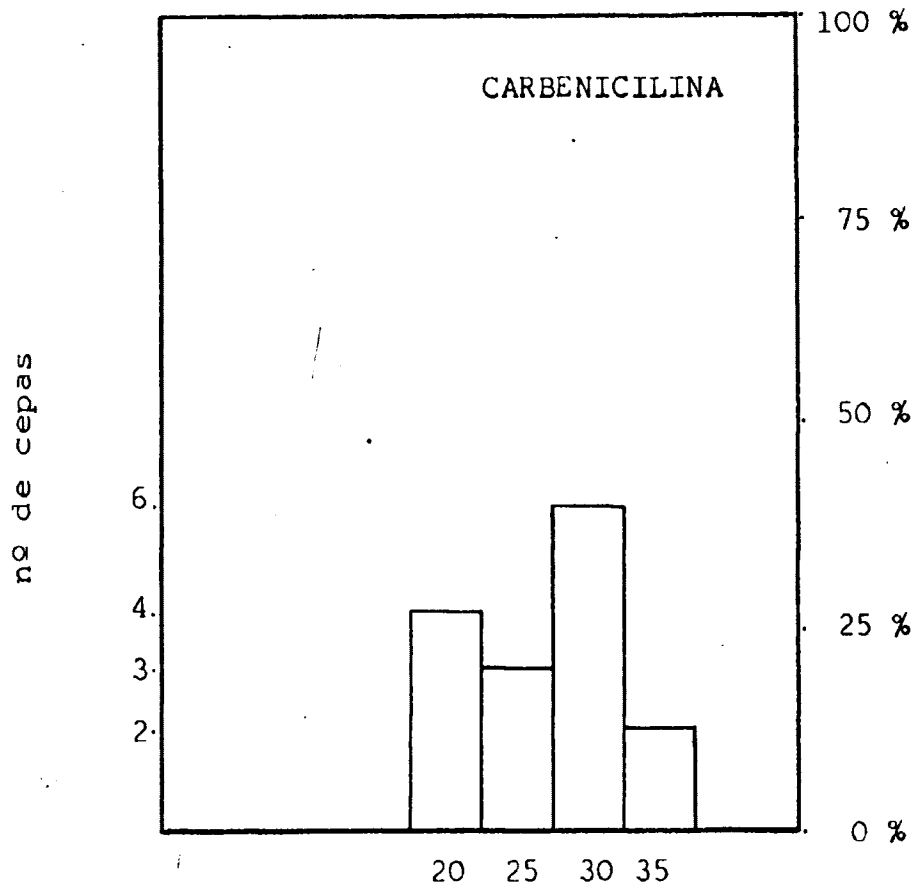
Diámetro del halo (mm)



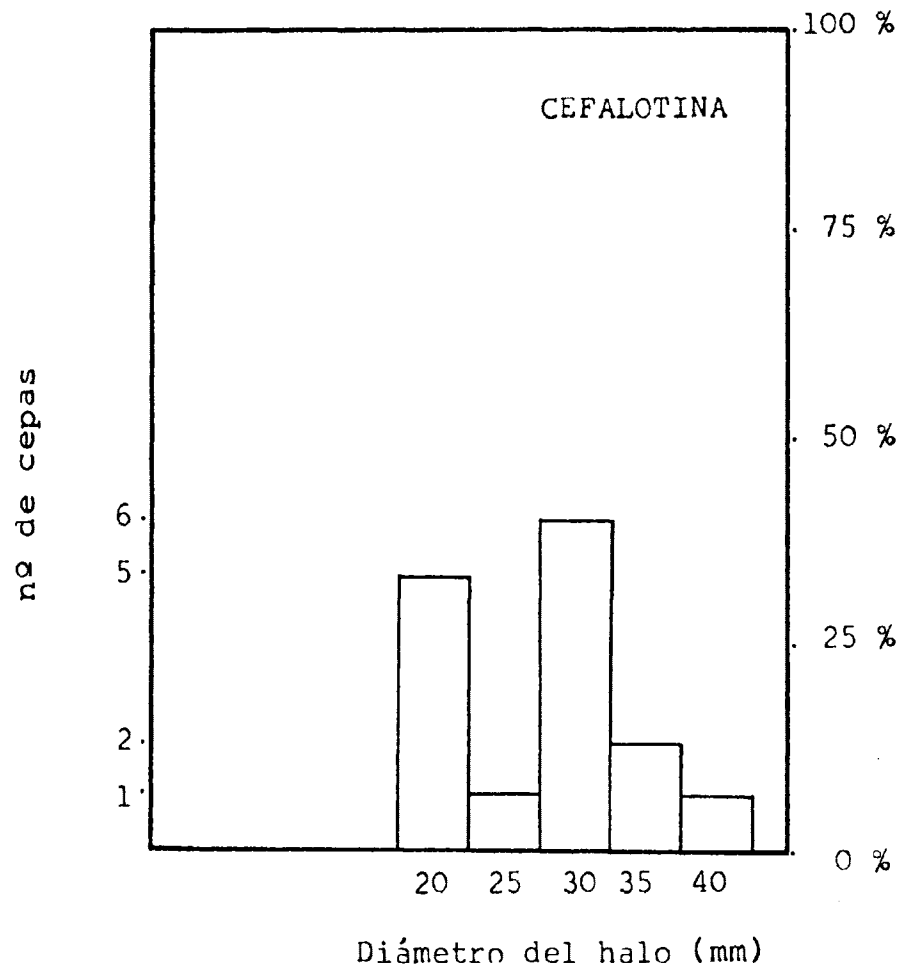
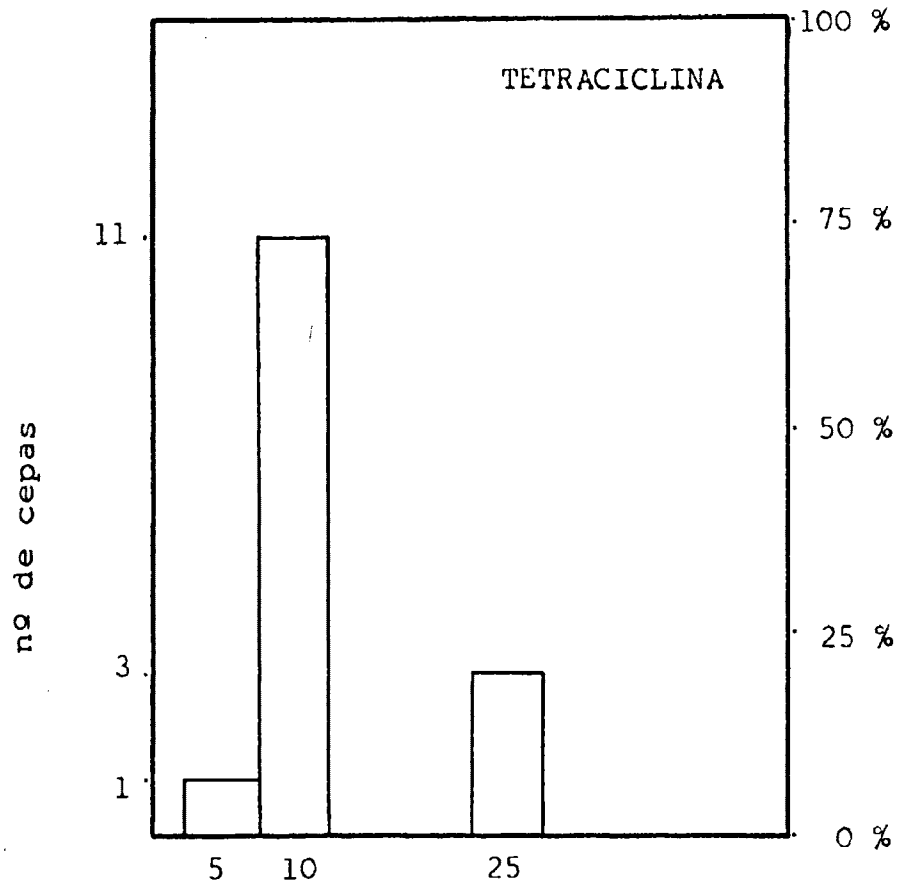
Diámetro del halo (mm)

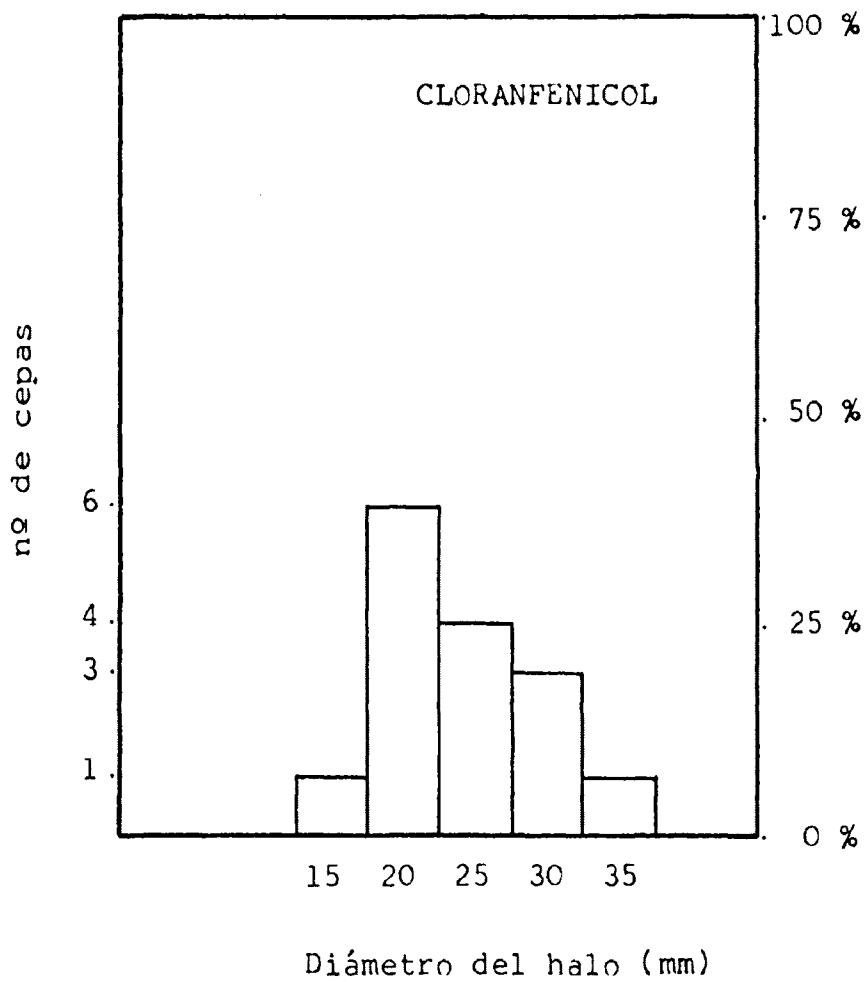
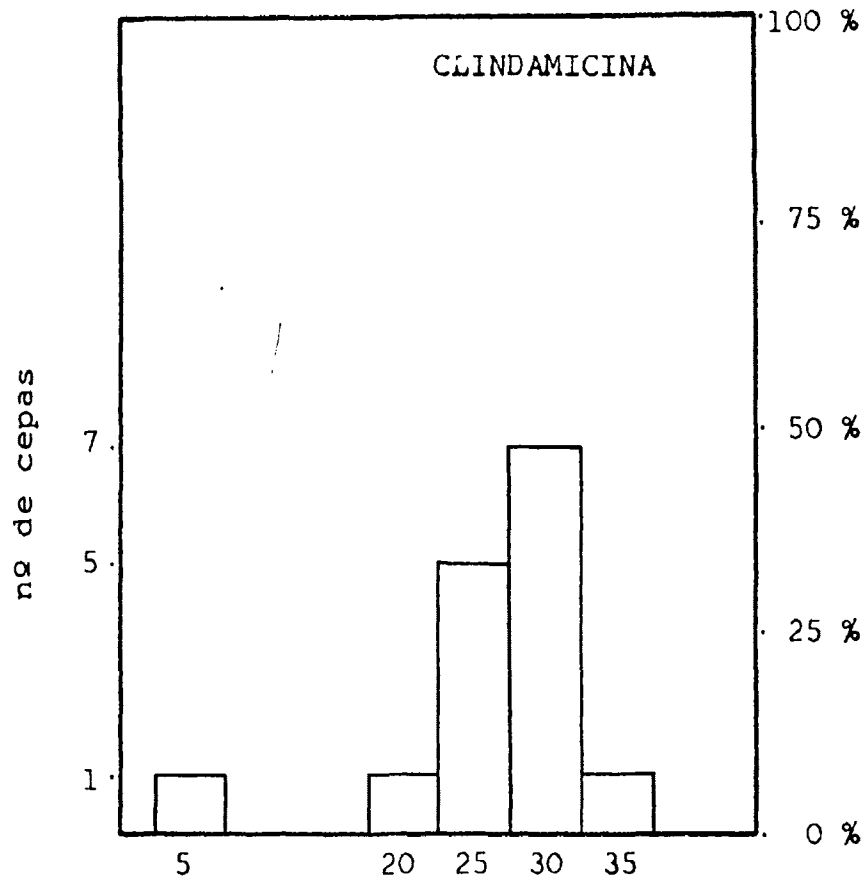


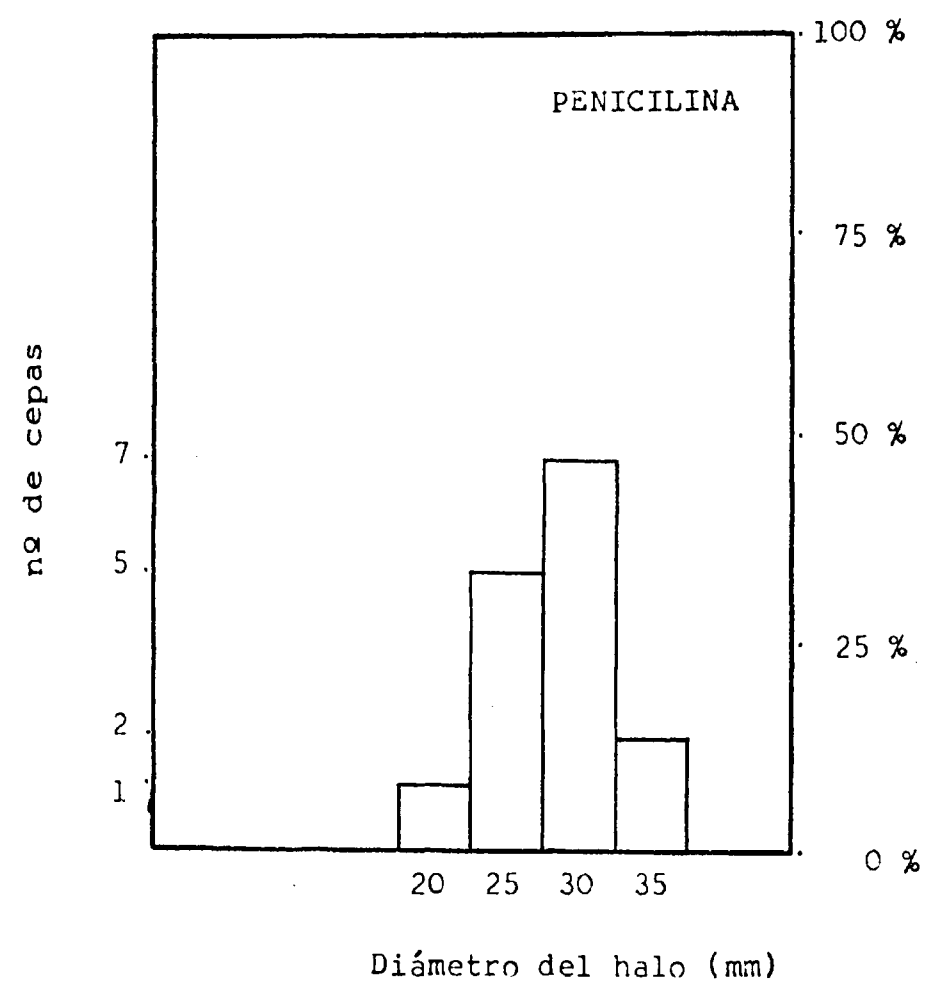
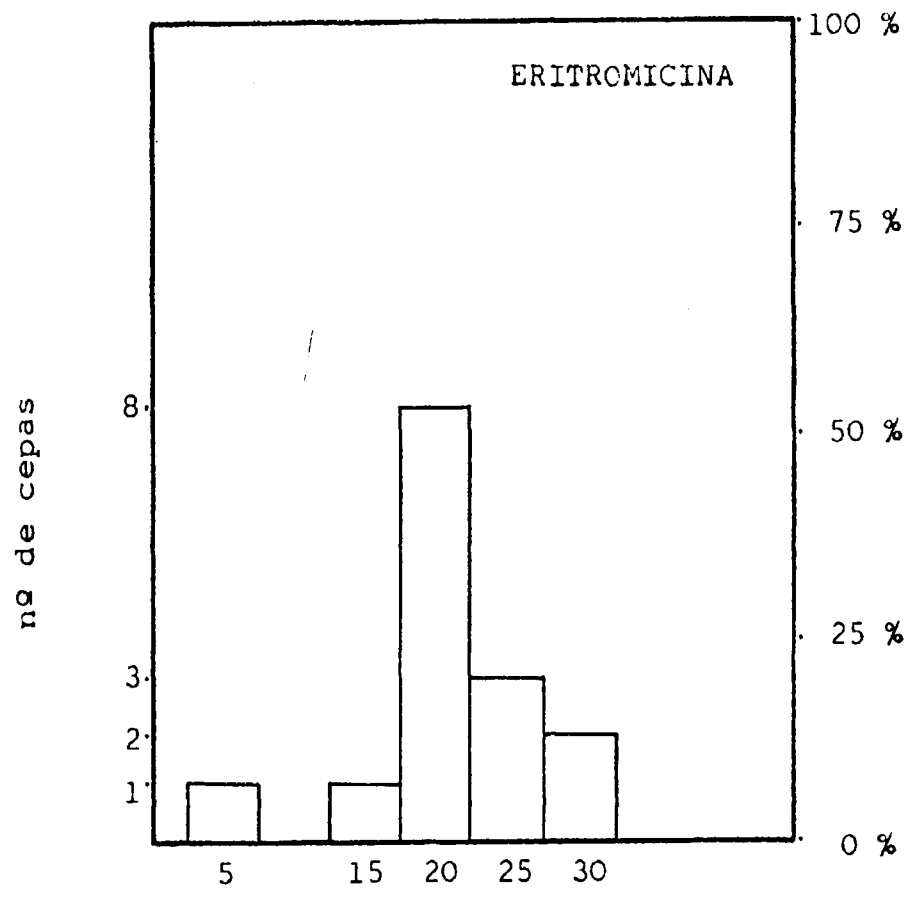




Diámetro del halo (mm)







PEPTOCOCCUS CONSTELLATUS		cepa nº	Antibiótico						
	79	30	18	20	20	20	30	20	22
	30	25	25	30	18	18	34	26	26
	93	24	30	27	20	16	34	20	20
	94	32	30	30	22	20	25	20	22
	90	26	28	34	18	20	30	20	20
	92	30	20	22	20	21	22	18	24

PEPTOSTREPTOCOCCUS PARVULUS		cepa nº	Antibiótico						
	15	18	20	24	20	30	30	30	16
	18	18	20	24	20	30	30	30	16
	15	18	20	24	20	30	30	30	16
	18	18	20	24	20	30	30	30	16
	15	18	20	24	20	30	30	30	16
	18	18	20	24	20	30	30	30	16
	15	18	20	24	20	30	30	30	16
	18	18	20	24	20	30	30	30	16
	15	18	20	24	20	30	30	30	16
	18	18	20	24	20	30	30	30	16

PEPTOCOCCUS PREVOTI									
cepa nº	Antibiótico	AMPICILINA	TETRACICLINA	CEFALOSPORINA	ERITROMICINA	PENICILINA	CLINDAMICINA	CLORANFENICOL	CARBENICILINA
39		28	24	36	24	28	27	34	32

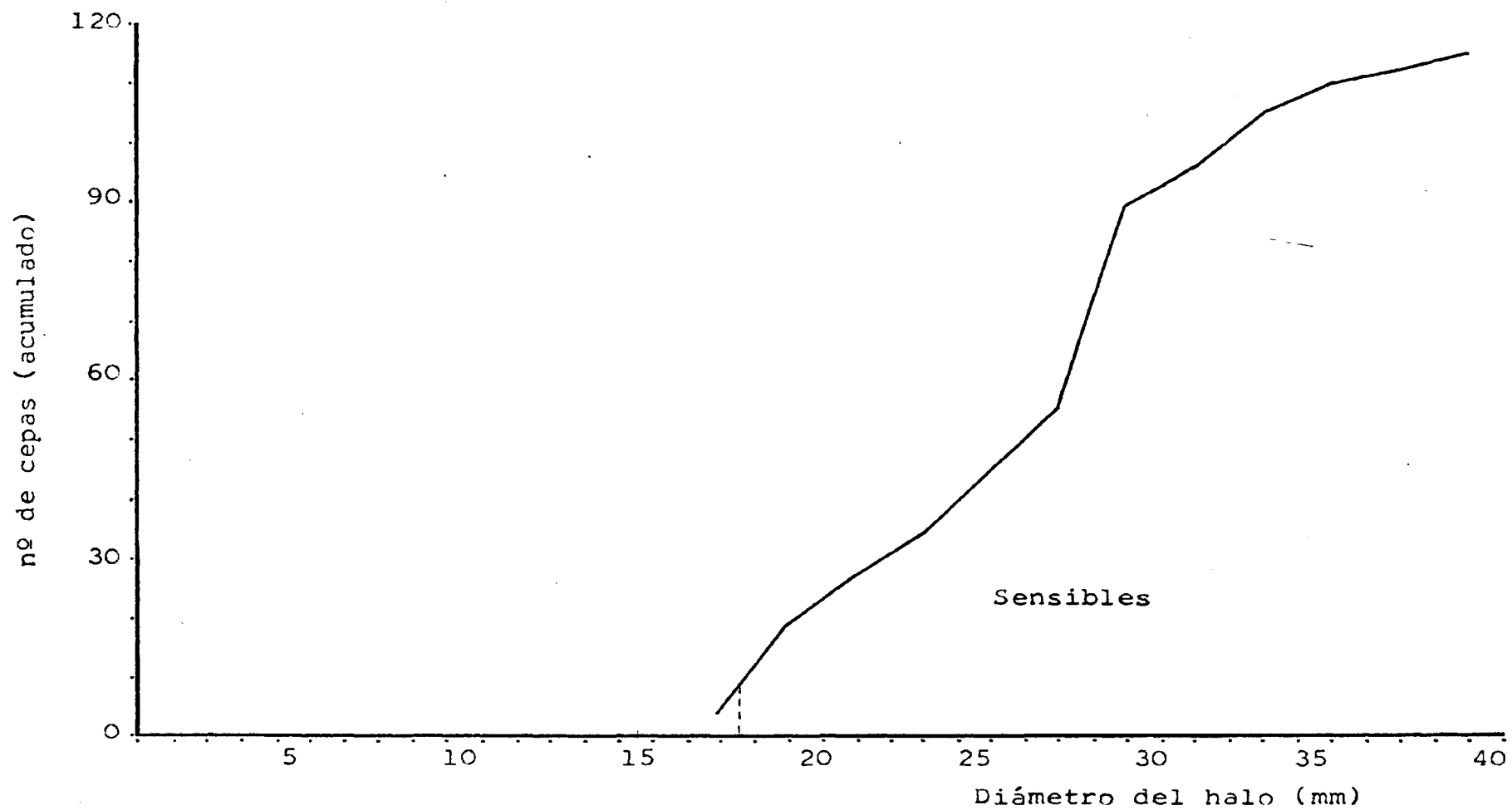
PEPTOCOCCUS AEROGENES									
cepa nº	Antibiótico	AMPICILINA	TETRACICLINA	CEFALOSPORINA	ERITROMICINA	PENICILINA	CLINDAMICINA	CLORANFENICOL	CARBENICILINA
72		29	9	30	15	18	30	30	28
56		32	8	28	14	20	34	36	30
76		28	10	30	15	22	34	30	32
37		25	12	34	18	24	32	30	30
31		30	11	30	15	20	28	28	25
40		26	10	30	20	20	30	30	28
64		32	6	32	18	20	32	32	32

GAFFKYA ANAEROBIA									
cepa nº	Antibiótico	AMPICILINA	TETRACICLINA	CEFALOSPORINA	ERITROMICINA	PENICILINA	CLINDAMICINA	CLORANFENICOL	CARBENICILINA
99		31	18	16	20	28	22	28	30
58		36	19	20	24	29	20	25	32
97		30	25	20	25	30	20	25	31
36		30	30	28	32	28	30	36	34

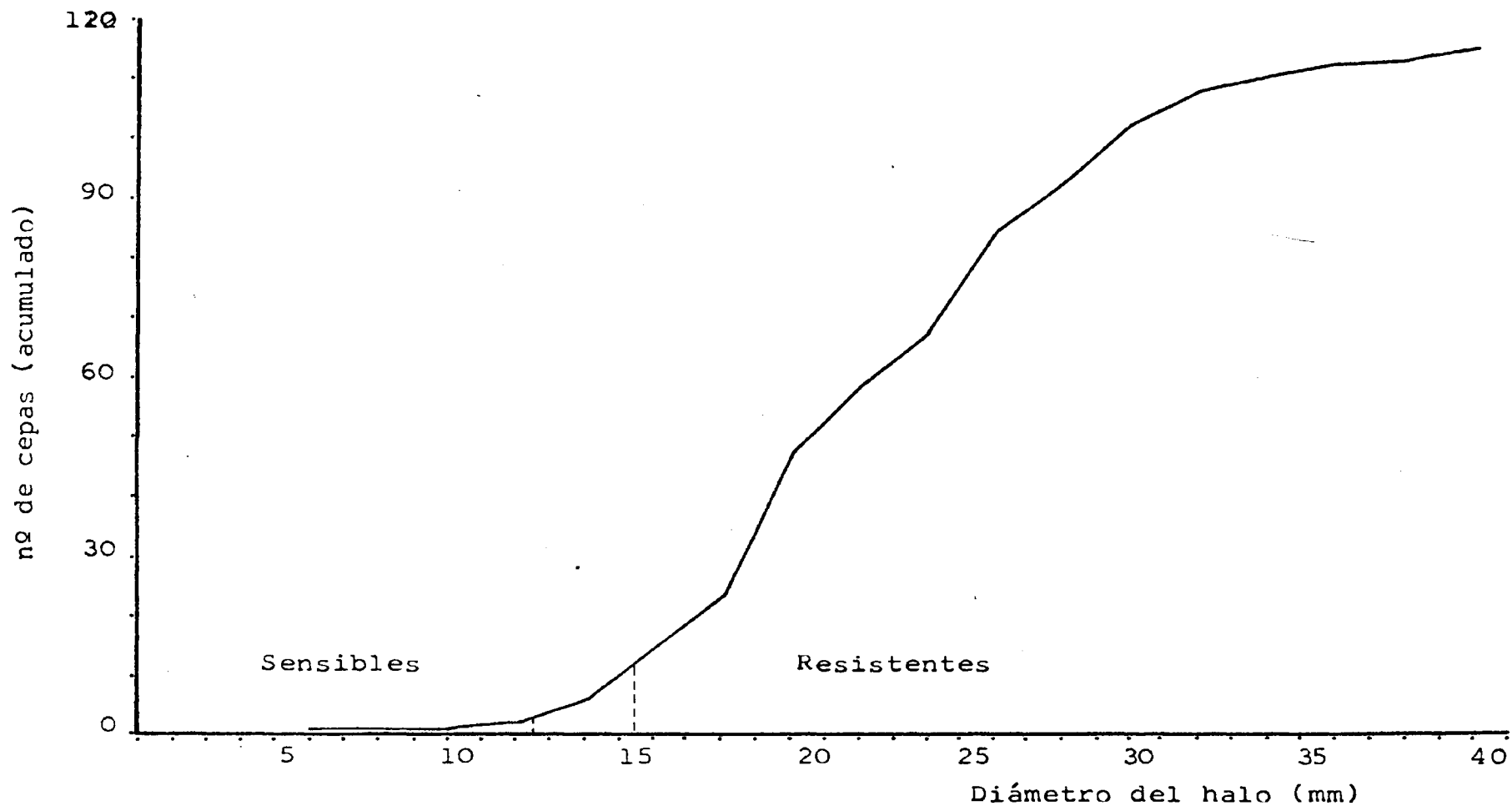
Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la TETRACICLINA



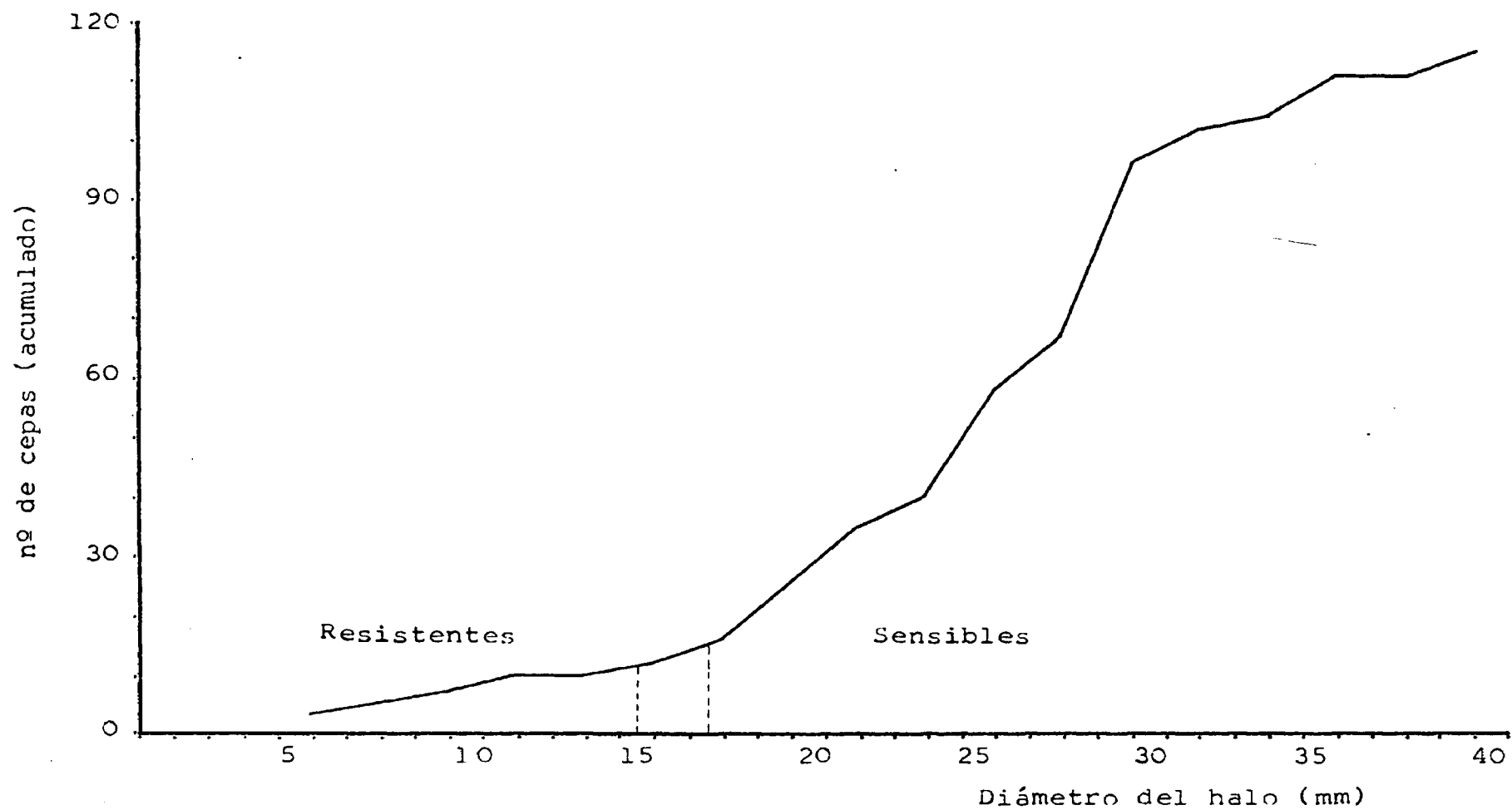
Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la CEFALOTINA



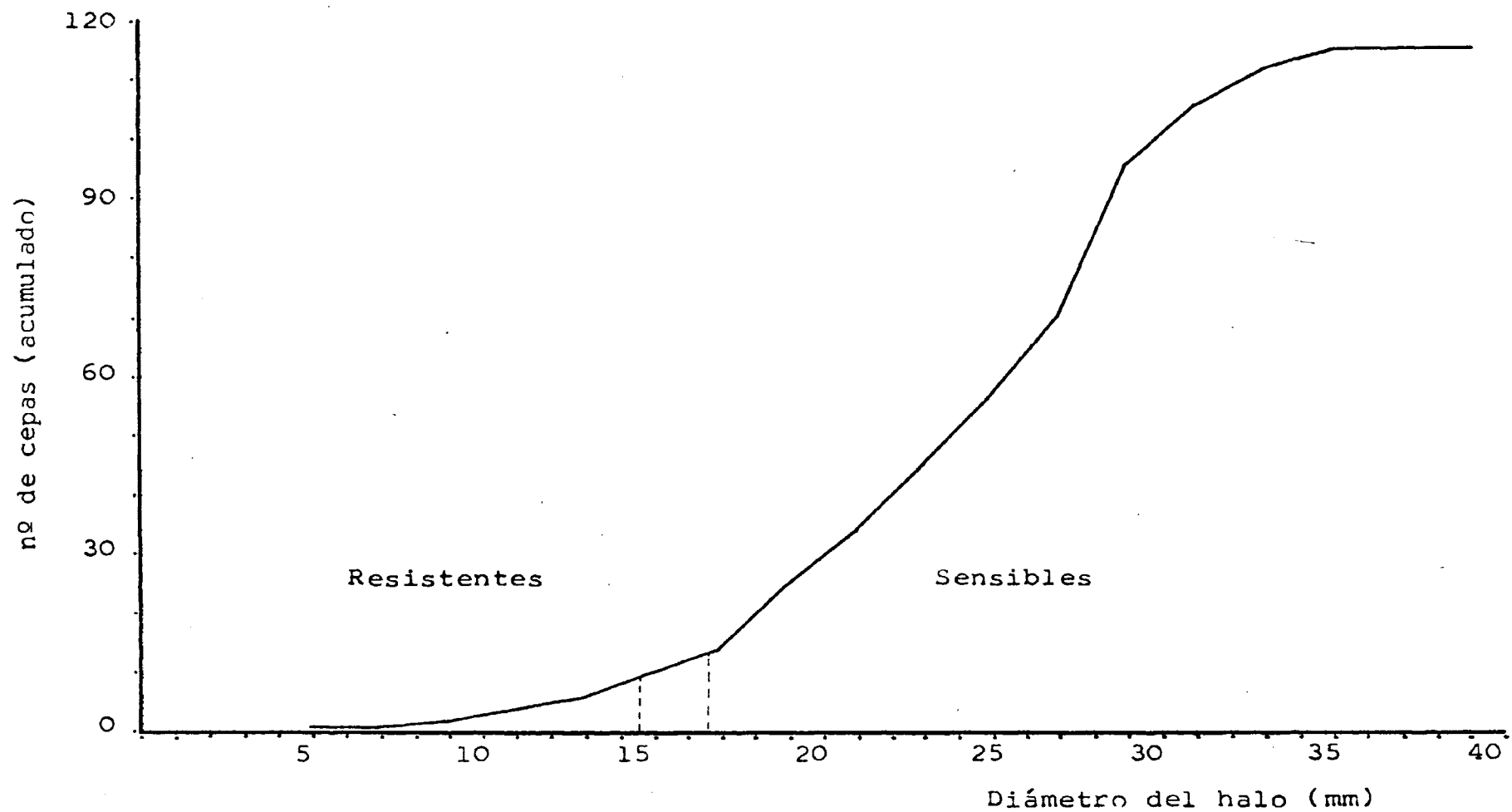
Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la ERITROMICINA



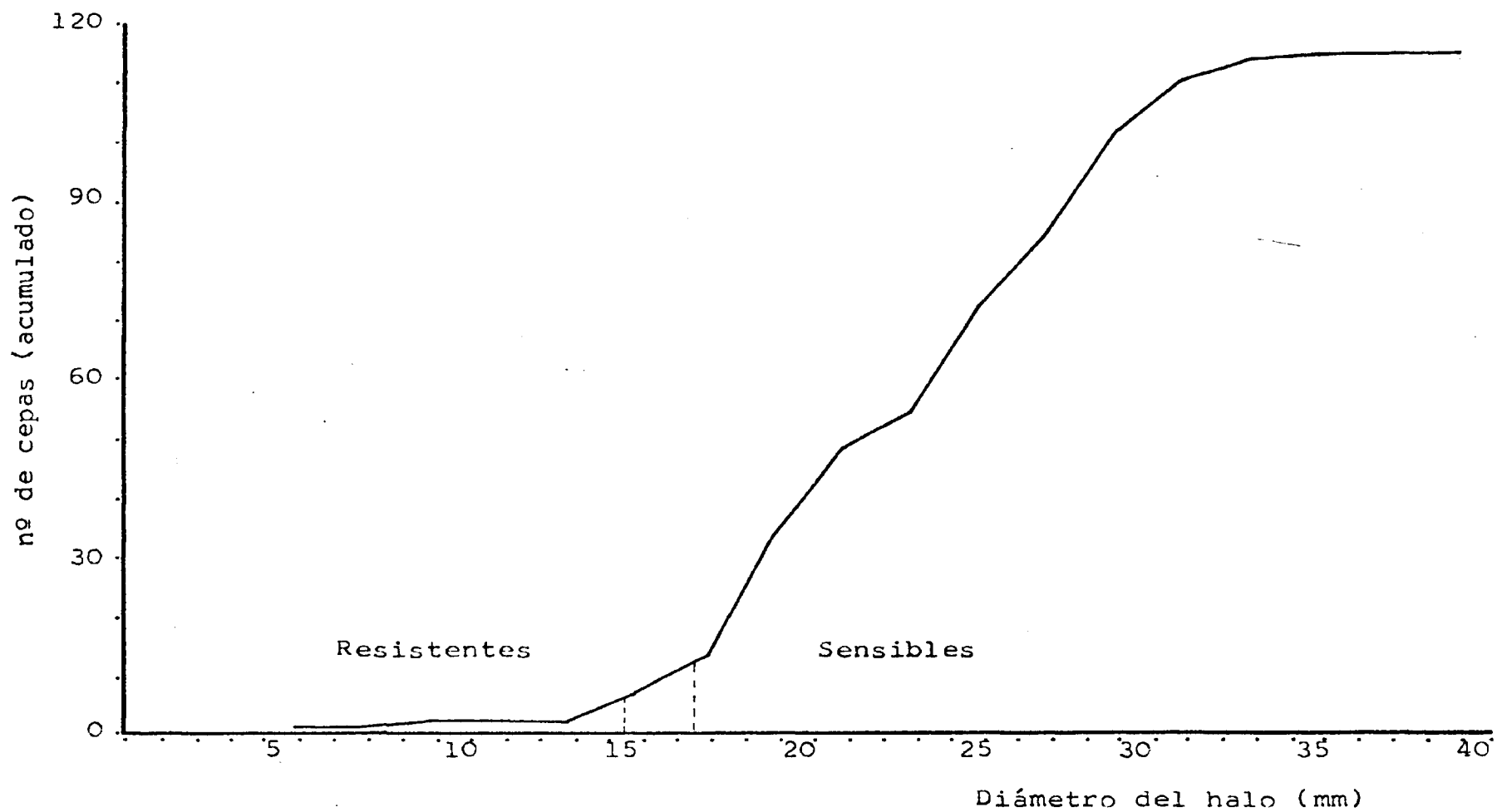
Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la PENICILINA



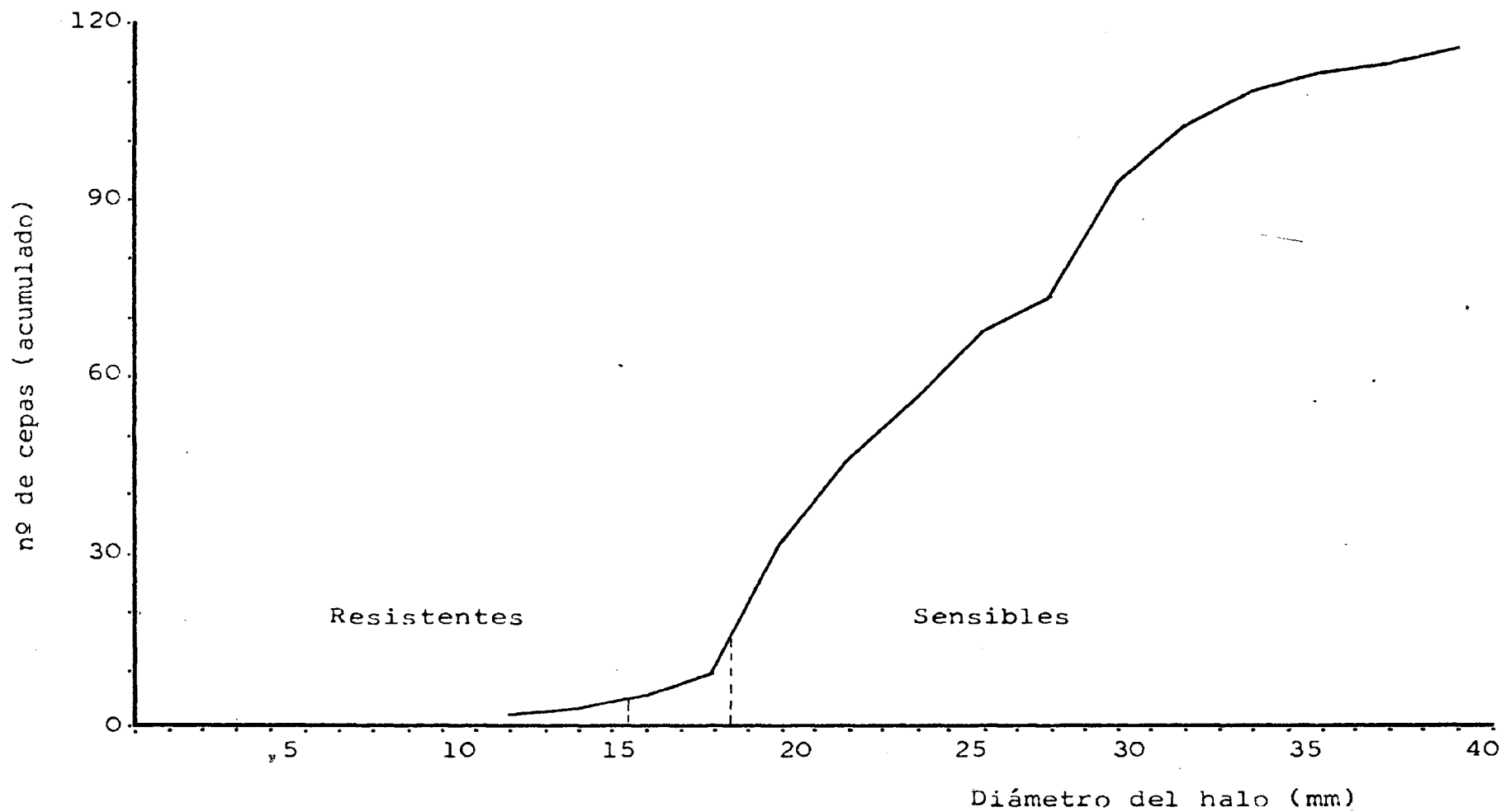
Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la CLINDAMICINA



Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados al CLORANFENICOL



Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la CARBENICILINA



Sensibilidad de los cocos anaerobios Gram (+) aislados a la AMPICILINA





Aspecto del antibiograma de una
cepa de *P. variabilis*.

IV.- D I S C U S I O N

Los cocos anaerobios Gram (+), presen -
tan una gran dificultad de cultivo e identificación ,
pues el crecimiento es muy lento, son muy sensibles -
al oxígeno atmosférico Hårdier (78) y las reacciones
bioquímicas no diferencian en muchos casos unas espe-
cies de otras. Hemos tratado de hacer un estudio com-
parativo de los resultados obtenidos en la identificaca
ción por medios standarizados, rápidos y al alcance -
de cualquier laboratorio frente a los métodos conven-
cionales usados hasta ahora.

Otro problema importante es la clasifi-
cación de estos gérmenes ya que actualmente existen -
varias clasificaciones de cocos anaerobios Gram (+) -
sin que ninguna de ellas tenga una aceptación univer-
sal.

Para la clasificación de las 115 cepas
aisladas, se ha seguido el "Anaerobe Laboratory Ma -
nual" de Holdeman y Moore (64), por ser actualmente
el manual más utilizado para la clasificación de bacte
rias anaerobias, se pudieron clasificar siguiendo

a estos autores 96 cepas. No obstante, 8 cepas de las 115 aisladas, cuyas características bioquímicas no coincidían con ninguna especie de las descritas por dicho manual, se han podido clasificar según el Bergey's Manual 8ª Ed. (42) coincidiendo con el Peptococcus aerógenes, esta especie no la describen Holdeman y Moore (64). Sin embargo, por ninguno de los dos manuales anteriores ha sido posible la identificación de las 11 cepas restantes ya que todas las pruebas bioquímicas ensayadas han sido negativas.

Las pruebas bioquímicas para la identificación de los cocos anaerobios Gram (+), se han realizado por dos métodos:

- Métodos convencionales.

- Métodos standarizados "API 20 Anaerobios"

- Para la identificación por métodos convencionales hemos utilizado los azúcares más representativos como son: glucosa, maltosa, sacarosa, celobiosa, fructosa; otras pruebas tales como gelatina, indol, nitratos, catalasa y leche. La producción de gas en el medio Rosenow se anotó a las 72 horas de incubación.

Con los métodos convencionales, solamente se presentaron problemas con *Ps. intermedius* y *Ps. productus*, ya que con las pruebas bioquímicas utilizadas los resultados eran iguales para ambas especies. Para la definitiva identificación de aquellos se hicieron pruebas de cuatro azúcares más: manitol, xylosa, sorbitol y rhamnosa, quedando perfectamente diferenciados ya que de 31 cepas, 13 fermentaban los cuatro azúcares, aunque alguno lo hacían débilmente, resultando ser *Ps. productus* y las 18 restantes no fermentaban ninguno de los cuatro azúcares por lo que se identificaron como *Ps. intermedius*.

- Con los métodos standarizados, solamente tuvimos problemas con el test de la gelatina, pues la reacción fue en el 75 % de los casos débilmente positiva - pasadas 72 horas.

Las diferencias encontradas al compararlos dos métodos han sido las siguientes:

Hidratos de carbono:

Glucosa: 95 % de coincidencia por los dos métodos -

dos, Nord y col (76) obtienen un 99 %,
Moore y col (75) el 90 %, Hansen y -
Stewart (77) el 90 %.

Manitol: 93,0 % de coincidencia por los dos mé
todos, Nord y col (76) obtienen un -
99 %, Moore y col (75) el 88,46 %, -
Hansen y Stewart (77) el 95,4 %.

Sacarosa: 96,5 % de coincidencia por los dos -
métodos, Nord y col (76) obtienen el
99 %, Moore y col (75) el 88,46 % ,
Hansen y Stewart (77) el 78,9 % .

Maltosa: 96,5 % de coincidencia por los dos mé
todos, Nord y col (76) obtienen el -
99 %, Moore y col (75) el 88,46 %, -
Hansen y Stewart (77) el 78,9 %.

Xylosa: 98,3 % de coincidencia por los dos mé-
todos, Nord y col (76) el 94,62 % y -
Hansen y Stewart (77) el 84,6 %.

Celobiosa: 89,6 % de coincidencia por los dos

métodos, Nord y col (76) obtienen el 99 %, Moore y col (75) el 93,85 % , Hansen y Stewart (77) no ensayan esta prueba.

Sorbitol: 99,1 % de coincidencia por los dos métodos, Nord y col (76) obtienen el - 100 %, Moore y col (75) el 98,46 % , Hansen y Stewart (77) no ensayan esta prueba.

Rhamnosa: 98,3 % de coincidencia por los dos métodos, Nord y col (76) obtienen el - 100 %, Moore y col (75) el 97,69 % , - Hansen y Stewart (77) no ensayan esta prueba.

Respecto a otras pruebas de identificación las diferencias han sido las siguientes:

Gelatina: Los resultados positivos obtenidos por nosotros son bastante bajos, 77,4 % - respecto a las demás pruebas de identificación utilizadas. En la bibliograa -

fía revisada los resultados son muy -
discrepantes, desde un 99 % obtenido
por Nord y col. (76) hasta un 37,69 %
de Moore y col. (75). Estas diferen -
cias son demasiado grandes, el valor
obtenido por nosotros es más lógico -
aunque no dudamos en señalar que la -
prueba de la gelatina es la menos con -
cluyente del método API.

Indol: Los resultados positivos obtenidos por -
nosotros son muy buenos, 100 %. Estos re -
sultados coinciden bastante con las expe -
riencias realizadas por Hansen y Stewart
(77) que obtienen un 99,4 % de coinciden -
cia; sin embargo, Nord y col. (76) y -
Moore y col. (75) dán para el indol 92 %
y 91,5 % respectivamente, aunque estos -
resultados más bajos los creen debidos -
a que el aceite con que se creaba la -
anaerobiosis en el "Método API 20 Anaero -
bios" no era mineral, ni se hacia la -
extracción del indol por xileno como se
hace actualmente.

El valor medio de coincidencia que hemos obtenido para la identificación de los cocos anaerobios Gram (+) al comparar los métodos: convencional y API, ha sido del 95,29 %, los métodos standarizados dan por tanto buenos resultados, teniendo en cuenta que la prueba de la gelatina no es fiable - tanto en nuestras experiencias como en la bibliografía revisada (76,75).

La totalidad de los cocos anaerobios Gram (+) identificados en las muestras estudiadas ha sido del 19,43 %, correspondiendo el 6,08 % a Peptostreptococcus y el 13,34 % a Peptococcus, restando el 0,68% que los identificamos como Gaffkya anaerobia. Estos valores varían de unos autores a otros, - así Nord y col.(76), Hansen y Stewart (77) aislan en sus trabajos mayores porcentajes de Peptostreptococcus que de Peptococcus, por el contrario, Stokes (29), Kwok y col.(79), Wilkins y Thiel (80), Blacevic y Matsen (81), Pien y col.(82), Martin (37) encuentran una mayor frecuencia de Peptococcus que de Peptostreptococcus, lo que está de acuerdo con nuestras experiencias.

Observamos que los valores obtenidos por

Martin (37) 5029 especies anaerobias aisladas, 842 - (17 %) eran de Peptococcus y 427 (8 %) Peptostreptococcus son los que más se acercan a los obtenidos por nosotros (13,34 % de Peptococcus y 6,08 % de Peptostreptococcus) y, como las muestras estudiadas por dicho autor son mucho más numerosas que las de los demás autores, consideramos los resultados mucho más exactos, por lo que los porcentajes obtenidos por nosotros son correctos.

Las especies aisladas en este trabajo , han sido diferentes según su procedencia y los porcentajes se pueden ver en la tabla de la página 129.

Especies como *P. variabilis*, *Ps. intermedius* y *Ps. productus* aparecidos en cavidad oral en una proporción semejante a las de las demás muestras, no han sido descritas como flora habitual de la boca: la bibliografía revisada las señala como especies habituales en muestras patológicas (Holdeman y Moore, 64). La única cepa de *Ps. parvulus*, aislada en una muestra cariada, ha sido descrita dentro de la flora habitual de la boca por el Bergey's Manual 8ª Ed. (42).

Especies de *P. variabilis*, *P. asacharolyticus*, *P. prevoti*, *P. constellatus*, *P. aerogenes*, *Ps. intermedius*, *Ps. productus*, *Ps. micros* y *Gaffkya anaerobia*, aisladas de heridas en su mayoría postquirúrgicas, también han sido descritas como flora habitual en muestras patológicas (Holdeman y Moore, 64).

Las especies de *P. sacharolyticus*, aisladas de abscesos, han sido incluidas en la flora normal de la piel (holdeman y Moore, 64).

De las cepas de *P. variabilis*, *P. asacharolyticus* y *Ps. intermedius* aisladas de aspiración trans-traqueal, solamente las de *Ps. intermedius* han sido descritas como flora normal del tracto respiratorio por Thomas y Hare (26), ya que encontró esta especie en un 54,4 % de muestras procedentes de la superficie de las amígdalas y pared posterior de la faringe y en un 16,25 % de las muestras de amígdalas.

El estudio de la sensibilidad a los antibióticos de los anaerobios no tiene ninguna técnica standard y los resultados varían en relación con el -

inóculo, pH del medio, temperatura de incubación, me -
dios de cultivo utilizados y atmósfera de CO₂; (Ingham
83; Thorton, 84; Roseblatt, 85). De todos modos, la
multitud de técnicas empleadas hace que sea difícil -
comparar los resultados de diversos autores.

Por nuestra parte, hemos estudiado la -
sensibilidad a ocho antibióticos y al SPS que inhibe -
el crecimiento del *Ps. anaerobius* (Grave 69).

Los resultados los hemos representado en
histogramas para las especies en las que el número de
cepas aparecidas ha sido mayor de catorce, para las es
pecies que aparecieron en menor número se ha hecho un
cuadro donde se muestra el halo del diámetro en mm y -
el número de la cepa.

Finalmente, las gráficas que muestran la
sensibilidad de los cocos aislados a los ocho antibió-
ticos sin tener en cuenta la especie a que pertenezcan
cada uno se aprecian en las páginas

- Para la Tetraciclina: En el 40 % de las cepas-
estudiadas los halos de inhibición han sido menores de

15 mm considerándolas resistentes, el 2 % se encuentran en la zona intermedia (15-16 mm) y el 58 % restante fueron sensibles al antibiótico. Estos datos concuerdan con los hallados por otros autores, pues Fass y col (86) señala un 50 % de resistencia para este antibiótico. Wilkins (80) encontró un 26 % de resistencia cuando estudió cepas de *P. magnus*. Finegold y col. (87) observaron que la mayoría de las cepas estudiadas de cocos anaerobios (Gram (+)) fueron resistentes a este antibiótico.

- Para la Cefalotina: ha sido el antibiótico con el que mejores resultados hemos obtenido ya que ha sido eficaz en el 100 % de los casos estudiados. Esta sensibilidad la señalan también Finegold y col (87) y Sutter y col (88), sin embargo, Wilkins y col. (80) obtienen solamente un 94 % de sensibilidad para este antibiótico.

- Para la Eritromicina: Solamente hemos encontrado resistencia en el 0,08 % de los casos estudiados, siendo su halo inferior a 12 mm. El 0,8 % también se encuentra en la zona intermedia con halos entre 12-15 mm, el 98,4 % de las cepas restantes fueron sensibles.

Este antibiótico es el menos ensayado por los autores revisados, solamente Stalons y col. (89) lo probaron en cepas de Peptostreptococcus pertenecientes al grupo 11 de Thomas y Hare (26) señalando que fué el más eficaz junto a la Penicilina.

- Para la Penicilina: El 9 % de las cepas estudiadas fueron resistentes al antibiótico, siendo sus halos menores de 15 mm, el 1,5 % se encuentran en la zona intermedia entre 15-17 mm y el 89,5 % restante fué sensible. Estos resultados están de acuerdo con Kwok y col. (79) que encontró algunos cocos anaerobios Gram (+) resistentes a la Penicilina, sin embargo, Wilkins (80) señala solamente el 2 % de resistencia de sus cepas estudiadas a este antibiótico, Stalons y col. (89) encontraron gran sensibilidad cuando lo ensayaron con Peptostreptococcus pertenecientes al grupo 11 de Thomas y Hare (26).

- Para la Clindamicina: El 5,1 % de las cepas estudiadas, presentan halos inferiores a 15 mm, el 3,2 % se encontraron en la zona intermedia 15-17 mm y el 91,7 % fué sensibles. Estamos de acuerdo con los resultados de Wilkins (80) que señala el 8 % de resis

tencia para este antibiótico en contraposición de -
Fass y col. (85) pues todas las cepas estudiadas por
él fueron sensibles a este antibiótico.

- Para el Cloranfenicol: Solamente el 1,3 % de
las cepas estudiadas se mostraron resistentes al an-
tibiótico, el 98,7 % restante fué sensible. Esta sen-
sibilidad la señalan también Fass y col. (85), Kwok
y col. (79) y Wilkins y col. (80) ya que todas las -
cepas estudiadas por estos autores de cocos anaero-
bios Gram (+) fueron sensibles a este antibiótico.

- Para la Carbenicilina: El 5,1 % de las cepas
estudiadas fueron resistentes al antibiótico y el -
94,9 % restantes han sido sensibles. Blazevic y Mat-
sen (81) estudiaron 46 cepas de cocos anaerobios -
Gram (+), resultando todas sensibles a este antibió-
tico. Los demás autores revisados no ensayan este an-
tibiótico.

- Para la Ampicilina: El 2,6 % de las cepas es-
tudiadas fueron resistentes al antibiótico, el 2,6 %
se encontraron en la zona intermedia entre 15-17 mm
y el 94,8 % restante fueron sensibles. Estamos de -

acuerdo con los resultados de Wilkins (80) que se -
ñala un 6 % de resistencia para este antibiótico, ¹
en contraposición de Finegold y col. (87) y Fass y
col. (85) que dan una sensibilidad total para la Am
picilina.

V.- CONCLUSIONES

19.- El aislamiento de los cocos anaerobios Gram (+), -
presenta varios problemas:

- El crecimiento es muy lento y la incubación en condiciones anaerobias no debe ser nunca inferior a 48 horas.
- Gran sensibilidad al oxígeno atmosférico , por lo que la siembra de la muestra debe hacerse en el mismo lugar de la toma, y si esto no es posible el tiempo que debe transcurrir no debe exceder de quince minutos.
- La identificación por reacciones bioquímicas es complicada ya que en muchos casos estas no diferencian claramente unas especies de otras.

20.- El medio de Rosenow, según hemos comprobado, es el ideal para el crecimiento de estos gérmenes exigentes y para la observación de la producción de gas.

30.- Creemos que siempre deben sembrarse tres placas -

de medio BHIA con la muestra e incubarse en aerobiosis, atmósfera con un 10 % de CO₂ y en anaerobiosis respectivamente. De esta manera, los aerobios y anaerobios facultativos podrán desecharse fácilmente.

49.- Siempre debe comprobarse la anaerobiosis en tuo - bos de VLP sembrados a partir de la placa crecida en anaerobiosis y sólo debe aceptarse como anaerobios estrictos, aquellas cepas en las que no aparezca crecimiento en la zona donde el poo - tencial redox es alto debido a la difusión del oxígeno atmosférico.

59.- Los métodos estandarizados para la identificación han dado resultados satisfactorios en el 95,29 % de los casos por lo que creemos que son recomenables para una identificación rápida en aquellos - laboratorios que no dispongan de muchos medios - técnicos.

Hay que tener en cuenta que el test de la geelatina es el que da peores resultados: 77 % de - coincidencia con los métodos convencionales a las

48 horas, lo que está de acuerdo con la bibliografía revisada.

6º.- La mayor frecuencia de los cocos anaerobios Gram (+) la hemos encontrado en las vías respiratorias, apareciendo en un 26,2 % de las muestras orales y en un 100 % de las de aspiración trans-traqueal.

7º.- Hemos comprobado que los cocos anaerobios Gram (+) van asociados a la flora aerobia correspondientes en un 97,4 % de los casos, sólomente en un 2,6 % - aparecieron en cultivo puro.

8º.- Las especies que con más frecuencia han aparecido han sido las siguientes:

Peptococcus variabilis	26 %
Peptostreptococcus intermedius	16 %
Peptococcus asacharolyticus	14 %
Peptostreptococcus productus	11 %
Peptococcus aerogenes	6 %
Peptococcus constellatus	5 %
Peptococcus sacharolyticus	3 %
Peptostreptococcus micros	3 %

Gaffkya anaerobia	3 %
Peptococcus prevoti	1 %
Peptostreptococcus parvulus	1 %
Sin identificar	10 %

99.- En el estudio de la sensibilidad a los antibióticos, hemos comprobado que el método disco-placa da muy buenos resultados, aunque debe añadirse - al medio de cultivo sangre lacada, ya que debido al escaso crecimiento de estos gérmenes, los - halos de inhibición en un medio sin sangre no se observan claramente.

109.- La Cefalotina es el antibiótico más eficaz frente a los cocos anaerobios Gram (+), siendo sensibles a él el 100 % de las cepas estudiadas, siguiéndole en eficacia la Eritromicina y el Cloranfenicol con los que solamente el 1,3 % de las cepas estudiadas fueron resistentes.

119.- La Penicilina, Clindamicina, Carbenicilina y Ampicilina también se muestran eficaces ya que solamente menos del 10 % de las cepas fueron resistentes a estos antibióticos.

129.- Por el contrario, la Tetraciclina ha sido eficaz solamente en el 58 % de los casos, es por lo tan to el antibiótico con el que peores resultados - hemos obtenido de los estudiados, no siendo recomendable su empleo.

VI.- BIBLIOGRAFIA

- 1.- PASTEUR, L., Experiences et vues nouvelles sur la nature des fermentations., C.R. Acad. Sci., (1861)., t. LII. p. 1260.
- 2.- VEILLON, A. et ZUBER, A., "Sur quelques Microbes Strictement Anaerobies et leur Role dans la Pathologie"., Arch. Méd. Exp., 10:517-545., (1898).
- 3.- VEILLON, A., "Sur un microcoque anaérobie trouvé dans les suppurations fétides.", Soc. de Biol., (1893).
- 4.- ROSEBACH., "Mikroorganismen bei der Wand-infektionskrankheiten Wiesbaden.,(1884)
- 5.- KRÖNIG, B., "On the nature of vaginal organisms, with particular reference to the occurrence of anaerobic streptococci in the vaginal secretions of pregnant women"., Z bl. Gynäk., 19:409-412 (1895).

- 6.- MENG, K., and KRÖNIG, B., "On different species of streptococci"., Mschr. Geburtsh., Gynäk., - 9:703 (1899).
- 7.- LEWKOWICZ, X., "Recherches sur la flore microbienne de la bouche des nourrissons"., Arch. - Med. Exptl., 13:633-660., (1901).
- 8.- NATVIG, H., "Bacteriological conditions in female genital secretions"., Arch. Gynaek., 76-701 (1905)
- 9.- SCHOTTMÜLLER, H., "The aetiology of febris puerperal and febris in puerperis"., Münch. Med. Wschr., 1:557., (1911).
- 10.- HOLMAN, W.L., and KRICK, F.H., Proc. Soc. Expt. Biol. Med., 20:280., (1923).
- 11.- HALL, I.C., and HOWITT, B., Proc. Soc. Expt. - Biol Med., 22:541., (1925).
- 12.- SCHWARZ, O.H., and DIECKMAN., Southern. Med. J., 19:470., (1926).

- 13.- COLEBROOK, L., "Infection by anaerobic streptococci impuerperal fever"., Brit.Med. J., 2:777., (1930).
- 14.- SCHWARZ, O.H., and BROWM. T.K., "Puerperal infections due to anaerobic streptococci., Amer. J. Obstet.Gynaec., 31:379 (1936).
- 15.- LEVINTHAL, W., "Ueber die anaërobe flora der menschiden Rochenschleimhaut., Zentrabl. Bacteriol. Parisitenk infektions., Kr. Hyg. Abl. I., 106:195-200 (1928).
- 16.- HALL. J.C., Micrococcus niger a new pigment-forming-Anaerobic coccus recovered from urine in a case of general arteriosclerosis., J. Bacteriol., 20:407-415., (1930).
- 17.- WHITE, E., "On the source of puerperal infections with anaerobic streptococci"., J. Obstet. Gynaec., Brit. Emp., 40:630., (1933).
- 18.- LEMIERRE, A., "On certain septicaemias due to anaerobic oranisms"., Lancet., 1:701-703.,(1936).

- 19.- MAC LENNAN, J.D., "Anaerobic infections of war wounds in the middle cast"., Lancet, 2:63., - (1943).
- 20.- HITE, K.E., HESSELTINE, H.C., and GOLDSTEIN, L., Am. J. Obstret Gynecol., 53:233 (1947).
- 21.- FOUBERT, E.L., Jr., and DOUGLAS, H.C., "Stu - dies on the anaerobic micrococci"., I. toxono mic considerations., J. Bacteriol., 56:25-34, (1948).
- 22.- EVANS, C.A., SMITH, W.M., JOHNSTON, E.A., and GIBLETT, E.R., J. Invest Dermatol., 15:305., (1950).
- 23.- DIGEON, M., RAYNAUD, M., Ann. Inst. Pasteur., 82:362 (1952).
- 24.- HARE, J., WILDY, P., BILLET, F.S., and TWORT., "The anaerobic cocci: Gas formation, fermenta - tion, reaction, sensitivity to antibiotic, and sulphonamides. Clasification"., J. Hyg., 50:295, (1952).

- 25.- WILDY, P. and HARE, R., "The effect of fatty -
Acids on the Growth. Metabolism and Morphology
of the Anaerobic Cocci"., J. Gen. Microbiol.,
9:216-225. (1953).
- 26.- THOMAS, G. G.A., and HARE, R., "The clasifica-
tion of anaerobic cocci and their isolation in
normal human beings and pathological processes".
J. Clin. Pathol., 7:300-304 (1954).
- 27.- MORRIS, E.D., Brit. Dent., J. 96:95-259 (1954).
- 28.- ROGOSA, M., FITZGERALD, R.J., MACKINTOSH, M.E.,
and BEAMAN, A.J., "Improved medium for selecti-
ve isolation of Veillonella"., J. Bacteriol., -
76:455-456. (1958).
- 29.- STOKES, E.J., LOND, M.B., "Anaerobes in routine
diagnostic cultures"., Lancet., 1:668-670.(1958).
- 30.- PREVOT, A.R., CADORE, F. and THOVENOT, H., Ann.
Inst. Pasteur., 97:860., (1959).
- 31.- WILLS, M.R., and REECE. M.W., "Non-clostridical

gas infection in diabetes mellitus"., Brit. -
Med. J., 2:566-568., (1960).

- 32.- ROGOSA, M., "The genus Veillonella., I. General cultural ecological and biochemical considerations"., J. Bacteriol., 87:162-170., -
(1964).
- 33.- ROGOSA, M., and BISHOP, F.S., "The genus Veillonella II. Nutritional studies"., J. Bacteriol.,
87:574-586., (1964).
- 34.- ROGOSA, M., and BISHOP, F.S., "The genus Veillonella III. Hydrogen sulfide production by growing cultures"., J. Bacteriol., 88:37-41 (1964).
- 35.- ROGOSA, M., "The genus Veillonella IV. Serological groupings and genus and species amendments"
J. Bacteriol., 90:704-709. (1964).
- 36.- ROTHERAM, E.B., SCHICK, S.F., "Nonclostridial -
anaerobic bacteria in septic abortion"., Amer.
Journal of Medicine. 46:80-89 (1969).

- 37.- MARTIN. W.J., "Practical method for isolation of anaerobic bacteria in the clinical laboratory"., Appl. Microbiology., 22:1168-1171.(1970).
- 38.- PREVOT, A.R., "Les streptocoques anaerobies", Ann. Inst. Pasteur. 39:417-447.(1925)
- 39.- PREVOT, A.R., "Manual de clasification et de -
determination des bacteries anaérobies"., 2d.
Ed. Masson et Cies., Paris. (1948).
- 40.- PREVOT, A.R., "Manual Clasification des Anaérobies"., 3a Ed. Masson., (1957).
- 41.- HARE, R., The anaerobic cocci. In H.P. Water -
son (Editor). Recent Advances in Medical Micro -
biology. Little, Brown and Company. Boston, p.p.
284-317 (1967).
- 42.- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology.,
7th Edition. The Williams and Wikins Company. -
Baltimore. (1957).
- 43.- BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology -

8th Edition., Willians and Wikins Company. Bal-
timore. (1974).

- 44.- KLUYVER and VAN NIEL., "Prospect for a natu -
ral system of classification of bacteria"., Zen.
Bakt. Par. Inf. Hyg. Abt. II., 94:369-403.(1936)
- 45.- DISTASO, A., "Contribution à l'étude sur l'in -
toxication intestinale., Zentrabl. Bakteriolog. -
Parasitenk infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. 62:
433-468 (1912).
- 46.- HALL. I.C., Gen I Micrococcus., Bergey's Manual
of Determinative Bacteriology., 6th Ed. The -
Willians and Wilkins. C.O., Baltimore, p.p., -
246-248 (1948).
- 47.- SCHOTTMÜLLER, H., Ein anaërober Staphylococcus
aërogenes als Erreger von Puerperalfieber. Zen
trabl Bakt., Para. Infek Hyg Abt I. Orig., 64:
270-284 (1912).
- 48.- MILLER, W.D., Einige gasbildende Spaltpilze des
Verdauungs-tractus, ihr Schicksal in Magen und

ith Reaktion auf verschiedene Spiesen. Deut. -
Med. Wochenschr., 12:117-119., (1886).

- 49.- PREVOT, A.R. and TAFFANEL., Recherches sur un -
nouveau coccus anaérobie staphylococcus activus.
Ann. Inst. Pasteur. Paris., 71:152-154. (1945).
- 50.- PREVOT, A.R., Diplococcus constellatus., C.R. -
Soc. Biol. Paris., 91:426-428. (1924).
- 51.- TISSIER and MARTELLY., Rescherches sur la putri
faction de la viande de boucherie., Ann. Inst -
Pasteur. Paris., 16:865-903. (1902).
- 52.- HAMM, A., "Die puerperale Wundinfektion"., Ju -
lius Springer. Berlin. 79. (1912).
- 53.- PREVOT, A.R., "Etudes de systématique bactérien
ne I. Lois générales II. Cocci anaérobis. Ann.
Sci. Natur Zool Biol Anim., 15:23-260 (1933).
- 54.- CARDON, B.P. and BARKER. H.A., "Two new amino -
acid-fermenting bacteria, Clostridium propionicum
and Diplococcus glycinophilus. J. Bacteriol. 52:

629-634. (1946).

- 55.- FOUBERT, E.L. Jr. and DOUGLAS, H.C., "Studies on the anaerobic micrococci. J. taxonomic considerations., J. Bacteriol 56:25-34 . (1948).
- 56.- JUNGANO, M., "Sur un staphylocoque anaérobie. - C.R. Soc. Biol. Paris., 62:707-708 (1907).
- 57.- FLÜGGE, C., Die Mikroorganismen. F.C.W. Vogel. - Leipzig.(1886)
- 58.- SCHOTTMÜLLER, H., Zur Bedeutung einiger Anaëroben in der Pathologie insbesondere die puerperalen Erkrankungen. Mitt Grenzgeb. Med. Chir., - 21:450-490 (1910).
- 59.- MIGULA, W., "System der Bakterien"., Vol. 2. Gustav Fischer. Jena (1900).
- 60.- PREVOT, A.R., "Sur une nouvelle espèce de streptococque anaérobie gazogènes: Streptococcus productus nov. spec., C.R. Soc. Biol., 135:105-107. - (1941)

- 61.- TISSIER, H., Coccus anaérobie des selles de l'homme., C. R. Soc. Biol. Paris., 94:426-427. (1962).
- 62.- REPACI, G., "Contribution à l'étude de la flore bactérienne anaérobic des gangrènes pulmonaires. Un streptobacille anaérobic., C.R. Soc. Biol. Paris., 68:216-218; 292-293; 410-412. (1910).
- 63.- WIEINBERG, M., NATIVILLE, R., and PREVOT, A.R., Les microbes Anaérobies., Masson and Co., Paris p.p., 1-1186., (1937).
- 64.- HOLDEMAN, L.V. and MOORE, W.E.C., "Anaerobe laboratory Manual"., Virginia Polytechnic Institute and State University Blacksburg, Virginia.(1972)
- 65.- BUTIAUX, BEERENS, TACQUET., "Manual de techniques Bactériologiques., 4^e Ed. 1974.
- 66.- SEBALD, M., TACQUET, A., BRICOUT, F., "Techniques en Bactériologie., 2. Anaerobies. Mycobacteries. Virologie"., Flammarion. Paris. (1973).

- 67.- BEERENS, H., TAHON-CASTEL, M., "Infections Humaines á Bactéries Anaérobies non Toxigènes"., Presses Académiques Européennes Bruxelles., - (1965).
- 68.- MARTIN, W.J., GADNER, M., WASHINGTON, J.A., "In vitro Antimicrobial Susceptibility of Anaerobic Bacteria Isolated from Clinical Specimens"., Antimicrob. Ag. Chemother., 2:148-158. (1972).
- 69.- GRAVE, M.H., MORELLO, J.A., KOCKA, F.E., "Sodium Polyanethol Sulfonate, sensitivity of anaerobic cocci"., Appl. Micr. June., 27:1131-1133., - (1974).
- 70.- BAUER, A.W., KIRBY, W.M.M., SHERRIS, J.C., TURCK, M., "Antibiotic Susceptibility testing by a Single Disc Method., Am. J. Clin. Pathol., 45:493-496. (1966).
- 71.- DOWELL, V.R., HAWKINS, T.M., "Laboratory Methods in Anaerobic Bacteriology, C.D.S. Laboratory Manual"., Center for Disease Control. Atlanta. - Georgia. (1972).

- 72.- WAHREN, A., HOLME, T., "Growth of Bacterioda -
ceae in Stirred fermentors"., Appl. Microbiol.,
18:235-239., (1969).
- 73.- MATSEN, J.M., BARRY, A.L., "Susceptibility tes-
ting: Diffusion test Procedure"., Manual of -
Clinical Microbiology., 2nd Ed. Edited by LEN-
NETTE, SPAULDING et TRUANT. American Society -
of Microbiology. Washington., 418-427., (1974).
- 74.- SUTTER, V.L., KWOK, Y.T., FINEGOLD, S.M., "Stan-
dardized Antimicrobial disc susceptibility tes-
ting of Anaerobic Bacteria I. Susceptibility of
Bacteroides fragilis to tetracycline"., Appl. -
Microbiol., 23:268-275. (1972).
- 75.- MOORE, H.B., SUTTER, V.L. and FINEGOLD, S.M., -
"Comparison of three Procedure for Biochemical
Testing of Anaerobic Bacteria"., Journal.Clin.
Microbiol., 1:15-24. (1975).
- 76.- NORD, CARL-ERIK., DAHLBÄCK Ann., and WADSTRÖM.,
TORHEL., "Evaluation of a Test kit for Identifi-
cation of Anaerobic Bacteria"., Med. Microbiol.

Immunol., 161:239-242. (1975).

- 77.- HANSEN, L., and STEWART, J., "Comparison of -
API and Minitek to Center for Disease Control -
Methods for the Biochemical Characterization of
Anaerobes"., J. Clin. Microbiol., 4:227-231.,
Sept., 1976.
- 78.- HARDIER, J., "Anaerobes in the Mouth"., En Phi-
llips J., Sussman, M. (Eds)., "Infection with -
non-sporing anaerobic bacteria"., Churchill., -
Livingstone. Edinburgh., London an New York., -
99-130., (1974).
- 79.- KWOK., YUNG-YUAN., TALLY FRANCIS, SUTTER. L., -
VERA., FINEGOLD. M., SYDNEY., "Disk Susceptibi-
lity testing of Slow-Growing Anaerobic Bacteria"
Antimicrob. Agents. Chemother., 7:1-7., (1975).
- 80.- WILKINS, D.T., THIEL, T., "Modified Broth-Disk
Methods for testing the Antibiotic Susceptibili-
ty of Anaerobic Bacteria"., Antimicrob. Agents .
Chemother., 3:350-356., (1973).

- 81.- BLAZEVIC, D.J., MATSEN, J.M., "Susceptibility of Anaerobic Bacteria to Carbenicillin"., Antimicrob. Agents. Chemother., 5:462-465., - (1974).
- 82.- PIEN, F.D., THOMPSON, R.L., MARTIN, W.J., "Clinical and Bacteriologic Studies of Anaerobic Gram-Positive Cocci"., Clin. Proc., Mayo. 47: (1972).
- 83.- INGHAN, H.R., SELKON, J.B., GODD, A.R., HALE, J.M., "The effect. of Carbon dioxide on the Sensitivity of Bacteriodes fragilis to certain Antibiotics in Vitro"., J. Clin. Pathol., 23:254-258. (1970).
- 84.- THORTON, G.F., CRAMER, J.A., "Antibiotic Susceptibility of Bacteroides Species"., Antimicrob. Ag. Chemother., 509-513. (1970).
- 85.- ROSEMBLATT, J.E., SCHOENKNECHT, F.D., "Effect of Several Components of Anaerobic Incubation on Antibiotic Susceptibility test Results"., Antimicrob. Ag. Chemother., 1:433-440. (1972).

- 86.- FASS, R.J., PRIOR, R.B., et ROTILIE, C.A., "Simplified Method for Antimicrobial Susceptibility testing of Anaerobic Bacteria"., Antimicrob. Ag Chemother., 8: 444-452 (1975).
- 87.- FINEGOLD, S.M., SUGHARA, P.T., MITLER, A.B., -
"Susceptibility of anaerobic cocci to antibacterial agents"., Bacteriol. Proc., 67:96 (1967)
- 88.- SUTTER, V.L., et FINEGOLD, S.M., "Susceptibility of Anaerobic Bacteria to Carbenicillin, Cefoxitin and Related Drugs"., J. infect. Diseases., -
131:4., 417-422 (1975).
- 89.- STALONS, D.R., et THORNSBERRY, C., "Broth-Dilution Method for Determining the Antibiotic Susceptibility of Anaerobic Bacteria"., Antimicrob. Agents Chemothe., 7:15-21 (1975).