

centro médico

Cuerpo Ejecutivo.—Director - Jefe de Redacción: Dr. Rafael Campo Moreno; Administrador-Editor: Dr. Jorge Soto-Rivera.

Comité de Redacción: Dr. Antonio Sanabria, Dr. José Lara Díaz.

Colaboraciones: Se aceptan colaboraciones de miembros o no de la Sociedad Médica del Centro Médico de Caracas, sujetas a las siguientes condiciones: 1) Los trabajos deben ser leídos previamente por su autor en las reuniones mensuales de la Sociedad. los segundos miércoles de cada mes. 2) Deben ser entregados al Jefe de Redacción debidamente mecanografiados a doble espacio y en duplicado. 3) Deben ser inéditos. Sin embargo, nos reservamos el derecho de reproducir los trabajos que a nuestro juicio merezcan especial divulgación, haciendo constar la referencia bibliográfica correspondiente.

Frecuencia, reparto y canje: Se publica cada cuatro meses: ENERO, MAYO, SEPTIEMBRE de cada año. Se reparte gratuitamente. Solicitamos canjes con toda revista o publicaciones periódicas de ciencias médicas, cualquiera que sea el idioma en que esté impresa.

Dirección: Centro Médico de Caracas, Plaza del Estanque, San Bernardino, Caracas. Teléfono: 54.70.51 (veinte líneas).

La revista no se hace responsable o solidaria de los artículos que aparezcan identificados con el nombre del autor, salvo estipulación en contrario.



Vol. VIII - Nº 34 — Septiembre 1969

Director y Jefe de Redacción: Dr. R. Campo Moreno
Administrador - Editor: Dr. Jorge Soto Rivera

Esta Revista sustituyó al anterior Organó Científico Divulgativo de la Sociedad Médica del Hospital Privado "Centro Médico de Caracas", que se tituló:

PUBLICACIONES *del* CENTRO MEDICO *de* CARACAS

y del cual se publicaron 18 números hasta junio de 1963

SUMARIO

- Ante la Tumba del Colega y Amigo Dr. Félix Lairé, hijo
Por el Dr. José J. Gutiérrez Alfaro
- Métodos de Laboratorio en Bacteriología Anaeróbica
Traducción al Castellano por el
Dr. José J. Gutiérrez Alfaro 105
- Los costos del Servicio de Hospitalización, con Especial Referencia al Hospital Privado "Centro Médico de Caracas"
Por el Dr. Jorge Soto-Rivera 167

ESTAMOS AFILIADOS A:



ASOCIACION
VENEZOLANA
DE HOSPITALES



AMERICAN
HOSPITAL
ASSOCIATION



INTERNATIONAL
HOSPITAL
FEDERATION

**para suturas perfectas
que complementan todo buen
acto operatorio!**



SUTURAS
Ethicon

Perfecta uniformidad de calibre. Máxima resistencia a la tensión. En distintos tamaños y tipos, para todo requisito quirúrgico: en catgut, Mersilene[®] fibra poliéster, seda, algodón, nilón, tantalio, etc., con o sin aguja Atraloc[®].

Sp.—Suturas ETHICON, en sobras de aluminio, envasados en seco (en cajas) o en frascos con solución esterilizante.

En doctor:—Solicite catálogo ilustrado con detalles completos que le enviaremos gustosamente a sollicitud.

Johnson & Johnson International

Export Division—New Brunswick, N. J., U.S.A.

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD MEDICA:

Dr. Francisco Baquero González, Presidente
Dr. Alberto Guinand Baidó, Vice-Presidente
Dr. Harry Acquatella, Secretario
Dr. Néstor Arreaza Colizza, Tesorero
Dr. Gastón Arévalo Lizarraga, Bibliotecario

Dr. Francisco Brandt Pacheco, Vocal
Dr. Rafael Campo Moreno, Director de la Revista
Dr. José Lara Díaz y Alfredo González Bustillos, Redacción.

MIEMBROS ACTIVOS:

Acquatella, Dr. Harry
Aguero, Dr. Oscar
Alvarez, Dr. Pedro J.
Andrade Niño, Dr. Rafael
Andrade Niño, Dra. Zaira de
Arévalo Lizarraga, Dr. Gastón
Arreaza Colizza, Dr. Néstor
Alecio Morillo, Dr. Humberto
Bacalao Lara, Dr. Pedro
Bacalao Lara, Dra. Ela de
Blanco, Dr. Juan
Blanco León Dr. Jorge
Blanco, Souchon, Dr. Pedro
Beker, Dr. Simón
Beauperthuy, Dr. Luis A.
Banchs, Dr. Francisco
Baptista, Dr. Roberto J.
Baquero González, Dr. Francisco
Baquero González, Dr. Ricardo
Bencosme, Dr. Rafael
Bianchi Cayama, Dr. Fidias
Brandt Pacheco, Dr. Francisco
Brillembourg, Dr. Atilio
Brillembourg, Dr. Joaquín
Brilo, Dr. Víctor
Brilo Arreaza, Dr. Víctor
Bustamante Miranda, Dr. Oscar
Bustamante Esáa, Dr. Rafael
Calvo Lairét, Dr. Alejandro
Campo Moreno, Dr. Rafael
Carbonell, Dr. José Antonio
Castillo, Dr. Rafael
Cifuentes S., Dr. Bernardo
Clemente, Dr. Antonio R.
Conde Jahn, Dr. Franz
Conde Jahn, Dr. Francois
Chalraud Troconis, Dr. Román
Chitty Van de Walle, Dr. Alberto
D'Escrivan D. Julio C.
Dismanic, Dr. Moisés
Egui, Medina, Dr. Pedro
Escalona de Ayala, Dra. Livia
Fantes Kerdel, Dr. Francisco
Fuenmayor, R., Dr. Gustavo
Francisco, Dr. José
Gago, Dr. Otto
García Galindo, Dr. Gustavo
Garriga Michelieta, Dr. Esteban

García, Maldonado. Dr. Enrique
Gedeón, Dr. Rafael
Godayal Rovira, Dr. Juan
Goldstein, Dr. Carlos.
Gonzalo Leonardi, Dr. Pablo L.
Graterol Monserrate, Dr. J.
Gutiérrez Alfaro, Dr. José Jacinto
Gutiérrez Osorio, Dr. J. J.
Guinand Baidó, Dr. Alberto
Hedderich, Dr. Henrique
Hedderich, Dr. Hernán
Hermoso, Dr. Adán
Hernández, Dr. Agustín
Hernández Olivares, Dr. R.
Jaén, Dr. Rubén
Jacir C., Dr. Alberto J.
Jacir, C., Dr. Alfonso I.
Kozlow Jiménez, Dr. Adolfo
Krivoy, Dr. Abraham
Lairét, hijo, Dr. Félix (†)
Lambertí, Dr. José A.
Lara Díaz, Dr. José
Leamas, Dr. Luis
Leonardi, Dr. José Domingo
Linares Gori, Dr. Jesús
López, Dr. Hermógenes
López, Dr. Leopoldo E.
López Mendoza, Dr. Roberto
Gonzalo Leonardo, Dr. Luis
Lovera, Dr. Ramón E.
Lucca, Dr. Roberto J.
Mamán Dr. Alberto
Martínez Aguirre, Dr. Edgar
Martínez Niochet, Dr. Arminio
Martínez, Dr. Temístocles
Martínez Herrera, Dr. Roberto
Martínez, Iturriza, Dr. L.
Márquez Reverón, Dr. Armando
Mayobre, Dr. Ramón Augusto
Mendoza Alemán, Dr. Carlos
Miralles, Dr. Jesús
Molinos, Dr. Jesús R.
Montbrun, Dr. Francisco
Montenegro, Dr. Eloy
Montenegro, Dr. Gilberto
Morales, Dra. Gioconda Stopello de
Morales Rocha, Dr. Julián

Oderiz, Dr. Antonio J.
 Mota Salazar, Dr. A.
 Ochoa, Dra. Cristina Solís de
 Ochoa, Dr. José
 Ochoa, Dr. Manuel
 O'Daly, Dr. José Antonio
 Padula, Dr. Héctor
 Padrón Amaré, Dr. José A.
 Paris, Dr. Alberto Miguel
 Paz, Dr. Otto
 Peña, Dr. Luis
 Peña, Dra. María T. Hernández de
 Pérez Luciani, Dr. Vasco
 Pérez Giménez, Dr. Gustavo
 Pulido, Dr. Pablo
 Quijada, Gamboa, Dr. Cruz
 Quintero Muro, Dr. Eduardo
 Quintero Uzcátegui, Dr. Hernán
 Ramírez, Dr. Francisco
 Rivas Larralde, Dr. Eduardo
 Rodríguez Armas, Dr. Otto

Rodríguez Escovar, Dr. Rubén
 Ruan Santos, Dr. Hugo
 Salas, Dr. Rafael
 Sanabria, Dr. Antonio
 Sánchez Azopardo, Dr. José A.
 Sánchez Carrillo, Dr. Francisco
 Sánchez Pacheco, Dr. José R.
 Sánchez, S. Dr. Serafín
 Sánchez Vegas, Dr. Luis
 Scarcioffo, Dr. Pedro
 Sierralta, Dr. Asdrúbal
 Sosa Tinoco, Dr. Oscar
 Stolk, Mendoza, Dr. Gustavo
 Sucre Vegas, Dr. Carlos Vicente
 Tovar, E., Dr. Guillermo
 Valencia, Parparcón, Dr. Joel
 Velutini, Dr. Luis Alberto
 Vázquez, Dr. Jacobo
 Vázquez, Dra. Alicia S. de
 Villaba, Silva, Dr. Rafael
 Viana Rodríguez, Dr. Germán
 Zubillaga, Dr. Rafael

MIEMBROS ASOCIADOS:

Aasen, Dra. Imelda Campo de
 Albornoz, Dr. Agustín
 Argumosa y Valdés, Dr. J. A. de
 Astros, Dr. José Gilberto
 Attías Attías, Dr. Moisés
 Ayala, Dr. Luis A.
 Bello A., Dr. Alexis
 Bermúdez Dr. Reinaldo J.
 Bilbao C., Dr. Joseba
 Blanco Souchon, Dr. Carlos
 Braun, Dr. Peter
 Briceño Iragorry, Dr. Leopoldo
 Calzadilla, Dr. Rafael
 Castillo Plaza, Dr. Armando (†)
 Colina C., Dr. Oscar L.
 Clavel Penso, Dr. Rolando
 Cure Méndez, Dr. Farid
 Del Vecchio, Dr. José
 Díaz Aponte, Dr. Aldo
 Díaz Bruzual, Dr. Alfredo
 Ferrer, Dr. Alberto
 Guida, Dr. Franco
 González Palacios, Dr. R. G.
 Pieracci, Dr. Giorgio
 Granier, Dr. Marcel
 Grossmann, Dr. Victor
 Hajabi, Dr. Alfredo
 Hernández Navarro, Dr. Francisco
 Herrera Pinto, Dr. César
 Hitcher Santaella, Dr. Antonio

Holz, Dr. Siegbert
 La Corte, Dr. Agustín
 Larrazábal, Dr. Leopoldo
 León González, Dr. Félix
 Lizarraga, Dr. Pedro R.
 Matheus M. Dr. Noé
 Medina G., Dr. Oswaldo
 Negrón S., Dr. Alberto
 Núñez Mier y Terán, Dr. Sebastián
 Ortega Borjas, Dr. Armando
 Ortega Borjas, Dr. José Angel
 Ortega, Dr. Miguel
 Parra, Dr. Jorge
 Penso Tirado, Dr. Amador
 Pérez Tinco, Dr. Héctor
 Pifano, Dr. Félix
 Rivero, Dr. Alberto
 Rivero G., Dr. Eduardo
 Rodríguez Cabrera, Dr. J. H.
 Rodríguez Navarro, Dr. Manuel
 Ron Pedrique, Dr. Miguel
 Ruiz, Dr. Miguel
 Salas Marcano, Dr. Ismael
 Soto Rivera, Dr. Jorge
 Tineo Salazar, Dr. Jesús
 Trautmanis Z., Dra. Laima
 Uzcátegui Selvi, Dr. Iván
 Valero Martínez, Dr. J. A.
 Pizarro, Dr. Victor
 Padula, Dr. Victor
 Villalba, Dr. Gustavo
 Vivas Salas, Dr. E.

MIEMBROS HONORARIOS:

Dr. Roberto A. Hignson

Dr. Neal Owens.

Ante la Tumba del
Colega y Amigo
Dr. FELIX LAIRET Hijo

Dr. José J. Gutiérrez Alfaro



Hace apenas unas horas, en el mismo Hospital que él ideó y que con su esfuerzo y prestigio contribuyó a edificar y mantener, nuestro querido y respetado compañero, Doctor Félix Lairret hijo, dejó de existir entre las lágrimas y aflicción de sus familiares, colegas, amigos y personal del Hospital.

Urgentes problemas de inaplazable solución obligaron a la Directiva de la C. A. Centro Médico de Caracas a realizar una reunión extraordinaria, a pesar de que nuestros espíritus estaban en la casa del colega desaparecido y nuestros corazones experimentaban el más profundo sentimiento de dolor. Ante nuestro estado de ánimo, que nos hacía rechazar la reunión a pesar de la magnitud del problema por estudiar, pensamos que abcernos al trabajo en esos momentos, dolorosamente críticos, en que nuestro compañero de Directiva de largos años transitaba a la Eternidad, legándonos el ejemplo de sus preclaras virtudes de hombre, ciudadano, médico y directivo abnegado, pues aún en su lecho de enfermo seguía día a día paso a paso, todas nuestras actividades, juzgamos que esa reunión era el primer homenaje a su memoria, al dedicarnos, como él lo supo hacer, al estudio y solución de los problemas en las condiciones más adversas.

En dicha reunión expresé con toda la aflicción que su tránsito definitivo me produjo, algunas de las cualidades resaltantes de la personalidad humana del compañero de trabajo a quién supimos valorar por sus relevantes condiciones científicas y humanas, guardando seguidamente un minuto de silencio como tributo a su memoria.

Cuando el 27 de Septiembre de 1957, por ausencia temporal del Doctor Félix Lairt hijo, como Vicepresidente tuve que presidir los actos de conmemoración de los 10 años de funcionamiento del Centro Médico de Caracas, manifesté la honra que era para mí ocupar el lugar de tan insigne colega y mi incapacidad para suplir su magna personalidad. Conociendo su austeridad, la cual no era proclive a las alabanzas, aprovechando su ausencia, le tributé el elogio merecido.

Para los integrantes del Centro Médico de Caracas, el Doctor Félix Lairt hijo era uno de sus más prestigiosos representantes y gozaba de respeto unánime. Era el compañero a quién acudían a consultar sus problemas, desde sus colegas de antiguas promociones hasta los de las más recientes. Y en todo momento supo con ecuanimidad, discreción y caballerosos modales dar a cada quien el consejo acertado y la mediación apropiada.

Analizar la personalidad del Doctor Félix Lairt hijo, requiere tiempo para enfocarla en los diversos aspectos de su fecunda vida. Oportunidades habrá para hacer un análisis adecuado de ella y tributarle el justo reconocimiento a que se hizo merecedor.

Su prestigio de cirujano llegó hasta el zenit de la fama, no sólo por su habilidad y elegancia quirúrgica, sino también por su maravilloso sentido para el diagnóstico.

Hoy, cuando el austero colega se encuentra físicamente ausente para siempre, nos deja un valioso modelo a imitar: el doctor Félix Lairt hijo, como hombre y miembro de nuestro equipo directivo.

Tuve la satisfacción de trabajar en diversos periodos con él en la Junta Directiva. En todas esas oportunidades pude apreciar sus imponderables condiciones de bonhomía, capacidad para analizar los problemas, su justicia, su educación, su honestidad, su respeto a los principios de deontología médica, su carácter para tomar desiciones radicales cuando era necesario y valentía para asumir toda clase de responsabilidades.

Su actuación como Directivo de la Compañía se remonta al año 1942, cuando fue elegido como primer presidente de la C. A. Centro Médico de Caracas, en cuya casa de habitación se firmó el acta constitutiva. Figuró en nuestras directivas ininterrumpidamente desde 1956 hasta la fecha de su lamentable fallecimiento, ocupando la presidencia de la Directiva durante los periodos 1956-1958, 1958-1960 y 1960-1962.

Además el Doctor Félix Lairer hijo, formó parte del comité de construcciones del Hospital y siguió con dedicación el proceso de ampliación de nuestro edificio principal, anexo y demás remodelaciones posteriores.

Con asiduidad ejemplar, todos los sábados por la mañana pasaba horas en la Sede de la Directiva analizando con minuciosidad diversos aspectos de nuestra administración.

Desde hace 7 años el Doctor Lairer ejercía con celo sin igual el cargo de Tesorero de la Compañía y en su cartera guardaba cuidadosamente, en notas manuscritas, el movimiento económico de la Empresa.

Ya no veremos más la elegante y respetada figura del "Caballero de la Cirugía" Doctor Félix Lairer hijo, en los quirófanos, en el consultorio, en las habitaciones de los hospitalizados, ni en la Sede de la Junta Directiva donde por largos años su diligente actuación dejó grabada la huella indeleble de su personalidad.

Compañero:

Quiera Dios que estas improvisadas palabras, expresión sincera de mi más profunda admiración, lleve hasta tus manes el sentimiento de duelo que aflige a todos los miembros del Hospital Privado Centro Médico de Caracas por tu desaparición física. En este momento de la inhumación de tus restos mortales te expreso solemnemente el reconocimiento de todos por la valiosísima labor que cumpliste en pro de nuestra institución.

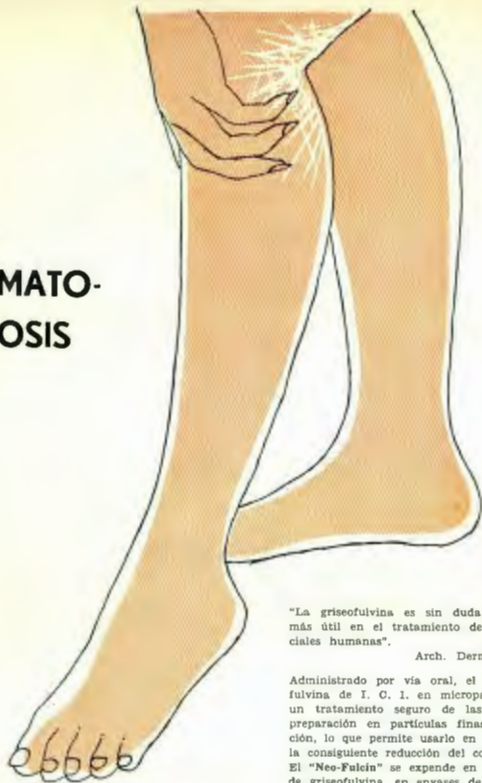
Tu ejemplar vida privada, profesional y ciudadana, te han merecido el sitio de honor que ya ocupas para siempre entre nuestros grandes compatriotas.

Los claros fulgores del triunfo iluminaron tu vida terrenal y serán perenne luz en la sombra de tu postrer morada.

Descansa en paz leal amigo.

Versión de las palabras pronunciadas por el Doctor José J. Gutiérrez Alfaro, Vice presidente de la C. A. Centro Médico de Caracas, a nombre de la Directiva y miembros del Hospital Privado Centro Médico de Caracas, en el acto de inhumación de los restos mortales del Doctor Félix Lairer hijo, el día Viernes 19 de Septiembre de 1969.

EN LAS DERMATO- MICOSIS



"La griseofulvina es sin duda el agente sistémico más útil en el tratamiento de las micosis superficiales humanas".

Arch. Dermatol. (1963), 87, 117

Administrado por vía oral, el "Neo-Fulcín" (griseofulvina de I. C. I. en micropartículas) proporciona un tratamiento seguro de las dermatomycosis. La preparación en partículas finas aumenta la absorción, lo que permite usarlo en dosis más bajas, con la consiguiente reducción del costo del tratamiento. El "Neo-Fulcín" se expende en tabletas con 125 mg de griseofulvina, en envases de 15 y 25 tabletas.

NEO-FULCIN

MARCA REGISTRADA



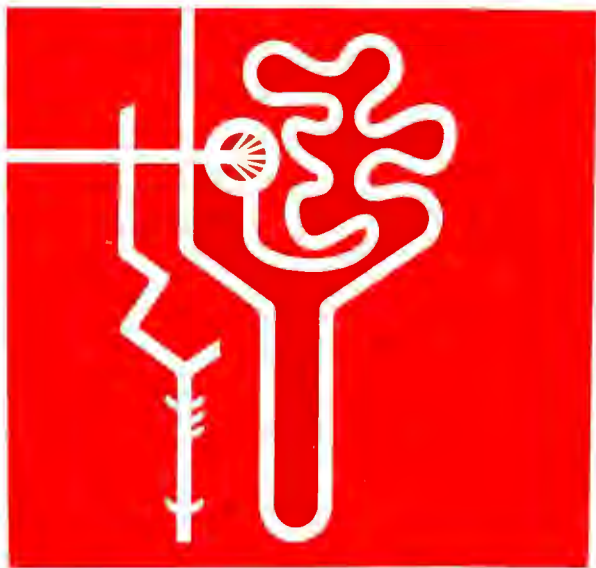
IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES LIMITED
PHARMACEUTICALS DIVISION Alderley Park Macclesfield Cheshire England

Distribuidores Exclusivos en Venezuela: H. KERN & CO., S. A.-Apartado 1567-Teléf. 34.05.11-Ext.

Infecciones del tracto urinario
Indicaciones para un rápido y
exitoso tratamiento con

Ceporan

cefaloridina



Para mayor información consultar con
LABORATORIOS GLAXO DE VENEZUELA, C. A.
Apartado 80.238 P. E. - Sabana Grande
Urb. La Trinidad - Baruta - Edo. Miranda
Teléfonos: 77.00.45 - 46



ITURBE HNOS. C.A.

Instrumentos, Aparatos
y Mobiliario

para Médicos,
Clínicas y Hospitales

PASEO DE LOS ILUSTRES - EDIF. RADS - LOCAL "B"

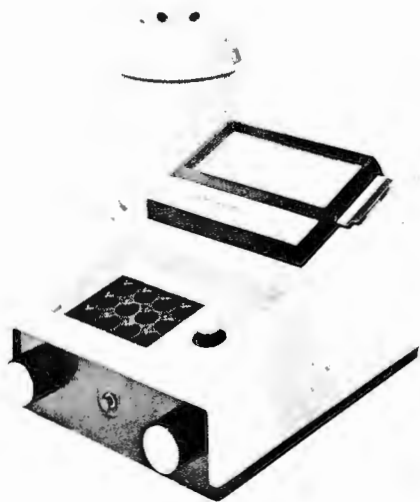
Frente a la Universidad - Los Chaguaramos

TELEFONOS: 61.59.31 - 61.93.08

CARACAS - VENEZUELA

El Unimeter es un equipo compacto y de alta precisión que permite, por el sistema "Unitest" efectuar exámenes de laboratorio en forma rápida y eficiente. Básicamente consiste de un colorímetro calibrado en forma precisa que da los resultados en forma directa. Una segunda parte está constituido por una centrifuga compacta de alta velocidad. Todo cuanto hace falta son 2 c.c. de sangre para numerosas pruebas directas: Glucosa sanguínea, hemoglobina, colesterol, nitrógeno uréico, ácido úrico, bilirubina, proteínas totales, fosfatasa alcalina, globulina y muchos otros.

Precisión, eficiencia y rapidez con el sistema "Unitest". Permitanos hacerle una demostración sin compromiso alguno.



Bio-Dynamics, Inc., Indianapolis, U. S. A.

Representantes Exclusivos para Venezuela:

COLIMODIO S. A.

ESTE 2 Y SUR 21 No. 148 — APARTADO 1053

C A R A C A S

**Mejor anestesia y
recuperación más rápida
con**

Halothan

> HOECHST <

**EL ANESTESICO DE INHALACION
MUNDIALMENTE ACREDITADO
PARA TODAS LAS EDADES**

- Extraordinaria estabilidad química. No inflamable ni explosivo.
- Inducción y recuperación rápida y suave.
- Menor consumo de relajantes musculares.
- No produce irritación de las mucosas.
Inhibe las secreciones bronquial, salival y gástrica.

PRESENTACION: FRASCO CON 250 ml



NUTIZYM®

digestivo bifásico de amplio espectro

1 gragea contiene:

- BROMELINA 50 mg. (en la caps. externa)
- PANCREATINA 400 mg. (en el núcleo*)
- BILIS DE BUEY 30 mg. (en el núcleo*)

Presentación:

frasco con 20 grageas

Nueva! frasco con 100 grageas

* el núcleo viene protegido por una caps. entérica



MERCK VENEZOLANA S.A

Apdo Sabana Grande 30787

Tfnos. 72 44 42 - 72 46 61

Caracas

NUEVO!

MINEVIN "T" *granulado*

11 VITAMINAS
5 MINERALES
4 OLIGOELEMENTOS

en una forma

más farmacéutica

más moderna

más estable

más agradable



Caja de 10 sobres.

Posología

Adultos: El contenido de un sobre, una o más veces al día según juicio facultativo.

Niños: 1 sobre diario.

Elaborado y Distribuido por:
LABORATORIOS QUIMICOS NACIONALES
"QUINAC"
Con licencia de COLLETT A/S
Oslo—Noruega

Comprimidos

Neutrilac

el único
antiácido natural

Neutrilac®



la acción neutralizante
natural de la leche
complementada
con antiácidos

Neutrilac

- hiperacidez
- acidosis gravídica
- hiperacidez por excesos en la bebida y el tabaco
- dispepsia
- gastritis
- úlcera péptica...



Kenatab

corta las
ALERGIAS
por
acción...

DOBLE



SQUIBB



Más de un siglo de experiencia inspira confianza

El moderno sucesor
de la solución de
dextrosa en agua, o
la solución isotónica
de cloruro de sodio

NORMOSOL

con Dextrosa al 5%

“... la solución
intravenosa de elección
para *mantener* el equilibrio
hidroelectrolítico durante
tratamientos intravenosos
rutinarios”.¹



NORMOSOL CON DEXTROSA AL 5%

para una terapéutica equilibrada
con múltiples electrólitos

Indicaciones

NORMOSOL con Dextrosa al 5% es una solución a base de hidrato de carbono y múltiples electrólitos, que permite mantener el equilibrio hidroelectrolítico durante la terapéutica intravenosa de rutina. Puede reemplazar la solución de dextrosa al 5% en agua, en prácticamente toda situación que ordinariamente requiere la administración de dextrosa por vía intravenosa. NORMOSOL con Dextrosa al 5% aporta los iones más importantes del plasma sanguíneo normal, pero sólo está destinado a la terapéutica de mantenimiento.

1. Gambino, S. R. y col.: *Current Med. Digest*, Dic. 1967, p. 1613.
2. Nelson, N. C.: *GP* 34:97, Dic. 1966.

Administración y posología

NORMOSOL con Dextrosa al 5% se administra por venoclisis o infusión intravenosa. La dosis total de 1500 ml. por metro cuadrado de superficie corporal suele ser adecuada en el adulto para satisfacer las necesidades diarias de agua y electrólitos. En niños se recomiendan 1600 a 2500 ml. por metro cuadrado. Para adultos, la dosis diaria promedio suele ser de 3 litros.

Presentación

NORMOSOL con Dextrosa al 5%, en botellas Abbo-Liter® de 500 ml. Cada 100 ml. de solución contiene Dextrosa 5 gm.; cloruro de sodio 234 mg.; acetato de potasio 128 mg.; acetato de magnesio 128 mg.; con adición de bisulfito de sodio 30 mg.; agua químicamente pura para inyección.



ABBOTT LABORATORIES, C. A.

Avenida Principal Los Cortijos de Lourdes
Caracas

Métodos de Laboratorio en Bacteriología Anaeróbica

Por los Dres.

V. R. DOWELL, Jr.

Sección de Bacteriología — Programa de Laboratorio
y

T. M. HAWKINS

Laboratorio de Consulta y Sección de Desarrollo,
Programa de Laboratorio

Traducción al Castellano por el
Dr. JOSE J. GUTIERREZ ALFARO.

Jefe de los Servicios de Laboratorio del Hospital Privado del Centro Médico de Caracas
y del Hospital Universitario de Caracas

Publicación Nº 1803 del Servicio de Salud Pública. Junio de 1968

Departamento de Salud, Educación y Bienestar de los E.E.U.U.

Servicio de Salud Pública. Administración de los Servicios de Salud e Higiene Mental.
Centro de Enfermedades Transmisibles. Atlanta, Georgia 30333

INDICE DEL CONTENIDO

Palabras Preliminares

- I Introducción
- II Aislamiento de las bacterias anaerobias del material clínico
- III Determinación de las características de cultivo y bioquímicas
- IV Investigación de las toxinas de los clostridios, pruebas de neutralización y de patogenicidad.
- V Tipaje de las toxinas de *Clostridium perfringens*.
- VI Aglutinación de *Corynebacterium acnes*
- VII Claves para la identificación de bacterias anaerobias
 - 1 Diferenciación primaria para determinación hasta nivel del género
 - 2 Llave dicotómica para los clostridios encontrados con mayor frecuencia

- 3 Características de los clostridios encontrados con mayor frecuencia
 - 4 Características morfológicas de un grupo representativo de bacilos Gram negativos
 - 5 Características de un grupo representativo de bacilos Gram negativos no esporulados
 - 6 Características de un grupo representativo de cocos
 - 7 Características morfológicas de los cultivos de actinomyces
 - 8 Características de un grupo representativo de bacilos Gram positivos no esporulados
- VIII Examen de los alimentos y suero sanguíneo para la investigación de C. botulinum**
- LX Examen de alimentos y heces para la investigación de C. perfringens**
Identificación serológica del C. perfringens
- X Conservación y envío de cultivos anaerobios**
- XI Medios de cultivo para el aislamiento de identificación de las bacterias anaeróbicas**
Introducción
Medios para placas
Medios diferenciales
Medios de conservación
- XII Reactivos**
- XIII Procedimiento de coloración**
Coloración de Gram
Coloración de esporas
- XIV Métodos para obtener anaerobiosis**
Uso de la jarra para cultivo anaerobico
Utilización de la jarra de Brewer
Utilización del Gas-Pack con la jarra de Brewer
- XV Referencias**
- XVI Bibliografía**

El uso de marcas registradas es solamente con fines de identificación y no involucra respaldo por el Servicio de Salud Pública o por el Departamento de Salud, Educación y Bienestar.

Palabras Preliminares

Honrado y complacido presentamos a las II Jornadas Venezolanas de Microbiología la versión al castellano del Manual de Técnicas de Laboratorio en Bacteriología Anaeróbica, escrito por los Doctores V. R. Dowell, Jr. y T. M. Hawkins, miembros del personal de eminentes profesionales que han hecho del NATIONAL COMMUNICABLE DISEASE CENTER una entidad de referencia mundial en lo que respecta a enfermedades transmisibles. Allí, un numeroso grupo de hombres y mujeres de las más diversas especialidades, se ocupan en investigar, diagnosticar, enseñar, preparar personal, viajar a remotas regiones a estudiar endemias o epidemias y colaborar con sus conocimientos para que el personal nativo de los países afectados resuelvan sus problemas, o bien, en recibir en su sede gratuitamente, a un numeroso contingente de visitantes que acuden a él en el deseo de beber en la fuente clara de su sabiduría y experiencia.

A una hora del "lunch" o del "coffee break" es significativo observar como al lado del respectivo Jefe se agrupan, por ejemplo una competente bacterióloga de la India con su típico SARI, un eminente virólogo de Belem de Para, un destacado veterinario de Guatemala y un médico oriundo de la tierra de Simón Bolívar. Allí, aún con las dificultades inherentes a no utilizar nuestra lengua nativa, profesores y alumnos nos identificamos en los problemas de la ciencia y los que confronta la humanidad y pensábamos con nostalgia como pueden existir hermanos que no puedan comprenderse. Así es el N. C. D. C. centro universal de ciencia y fraternidad.

Esta versión es el fruto de un entrenamiento durante tres meses en el Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica del NCDC, y aspiramos que los colegas venezolanos e iberoamericanos lo recibirán seguramente con beneplacito por servir de guía útil (hasta el presente la única existente en la especialidad), para el estudio sistemático de las bacterias anaeróbicas con una metodología ad-hoc realizable con material asequible a la mayoría de los Laboratorios de Bacteriología.

Aspiran los autores con la descripción de sus métodos y técnicas, probadas en miles de oportunidades, uniformar los procedimientos empleados, no sólo en su país sino en escala universal, de manera que los resultados obtenidos por cualquier Investigador en cualquier parte del mundo puedan ser repetidos por quien así lo desee, en condiciones similares. Estiman que esto constituye un fundamento indispensable para la clarificación de las clasificaciones y nomenclaturas de tales bacterias. Los autores saben que falta mucho por hacer, pero del estudio sistemático comparativo que ellos han realizado comparando las cepas de las colecciones con las aisladas de los productos patológicos recibidos, los ha llevado a establecer algunos grupos bien definidos, a concluir que algunas especies descritas como diferentes son iguales y posiblemente fijar cuales son las reacciones claves para la determinación de algunos géneros y especies. La tarea emprendida por los autores se facilitará con el empleo en escala universal de sus procedimientos.

La amplia bibliografía y las referencias incluidas al final del texto, nos exoneran de enumerar a los bacteriólogos que han insistido en la última década en la imperiosa necesidad de practicar rutinariamente cultivos en anaerobiosis, especialmente cuando las muestras provengan de los productos patológicos siguientes: pus abdominal, complicaciones pleuropulmonares e infecciones genitales, cuya incidencia en anaerobiosis alcanza cifras que llegan o pasan al 30%.

Si los clínicos y cirujanos deben tener presente la importancia actual de los anaerobios no esporulados, cuando los progresos de la cirugía ha hecho posible la realización de intervenciones quirúrgicas radicales, cuando los antibióticos, corticoesteroides y drogas inmunosupresoras se utilizan cada día con mayor frecuencia e intensidad, constituyen una serie de causas obligantes para que los Servicios de Bacteriología ofrezcan a los médicos condiciones propias para aislar adecuadamente miembros de la otrora quiescente "Flora endógena de Veillon".

No podríamos terminar estas breves palabras de introducción a la primera edición española del Manual, sin manifestar nuestras más cumplidas gracias al Doctor Pentti Kekko, Jefe del Programa de Laboratorio; al Doctor P. B. Smith, Jefe de la Unidad de Referencia Bacteriana y a los autores de aquél, Doctores V. R. Dowell y T. M. Hawkins.

Desearnos dejar constancia de nuestro reconocimiento al Doctor Dowell, Jefe del Laboratorio de Anaerobios, por sus enseñanzas, por su sincera amistad y por todas las atenciones y facilidades que nos brindó durante la permanencia en su Laboratorio. También consignamos nuestras expresiones de gratitud para todos y cada uno de los miembros del personal del Laboratorio de Anaerobios del N. C. D., quienes en todo momento y oportunidad fueron nuestros leales compañeros.

Si el objetivo de divulgar estas técnicas y procedimientos entre los Bacteriólogos de América es alcanzado, tal logro, será la más grande satisfacción para los autores del Manual y su traductor.

José J. Gutiérrez Alfaro
Atlanta, Abril 1968.

INTRODUCCION

La importancia clínica de las bacterias anaerobias particularmente la de los clostridios toxigénicos y la de algunos anaerobios no esporulados es bien reconocida, sin embargo nuestro conocimiento general de estas bacterias y su papel en las infecciones humanas y de animales es bastante limitado. Afortunadamente el interés por los anaerobios ha aumentado en estos últimos años y la metodología anaeróbica es actualmente empleada de rutina en la mayoría de los laboratorios clínicos y de salud pública. Este aumento de interés por los anaerobios ha ocasionado una demanda inmediata de microbiólogos y técnicos familiarizados con los procedimientos empleados en bacteriología anaeróbica.

Desde el establecimiento del Laboratorio de Bacteriología Anaeróbica en el National Communicable Disease Center (Centro Nacional de enfermedades transmisibles), se ha ofrecido un curso en métodos de laboratorio para bacteriología anaeróbica al personal de laboratorio calificado e interesado en este campo. Este manual, complementado con clases, ha sido destinado principalmente para usarlo como guía en los trabajos de laboratorio en los referidos cursos, siendo también útil como manual de consulta en el laboratorio sobre las técnicas anaeróbicas.

Los medios y técnicas descritos son empleados de rutina en el Laboratorio de Anaerobios del N.C.D.C. y las reacciones para los diferentes organismos presentados en los cuadros están basados en datos obtenidos con cultivos estudiados con estos métodos. Para poder comparar los resultados obtenidos por diversos investigadores es necesario estudiar los cultivos en condiciones uniformes, por lo cual se ha hecho un esfuerzo para **standardizar** los medios y técnicas tanto como ha sido posible.

Como este manual se revisa periódicamente, muchas personas han contribuido a su texto y organización. Los autores desean expresar su particular agradecimiento a la Dra. Lillian V. Holdeman, anteriormente encargada del Laboratorio de Anaerobios del N.C.D.C.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS ANAEROBICAS DE MATERIAL CLINICO

A.—Las bacterias anaerobicas pueden ser aisladas y estudiadas con bastante rapidez con la condición de tener en cuenta la rígida aplicación de ciertos principios básicos de la bacteriología anaerobica. Cuatro de las más importantes consideraciones en el cultivo de las bacterias anaerobicas son:

- 1.—Cultivar el material clínico inmediatamente después de su recolección.
- 2.—Utilización de medios frescos.
- 3.—Suministro de las condiciones anaerobicas adecuadas.
- 4.—Subcultivo de las colonias aisladas inmediatamente después de haber sido retiradas de la anaerobiosis.

Es imperativo cultivar el material clínico inmediatamente después de su recolección, porque algunos anaerobios son bastante sensibles al oxígeno y mueren rápidamente en un ambiente aerobico. En lo posible los líquidos aspirados son preferibles a los hisopados. Nunca permita que el material de los hisopados se seque. Si no es posible hacer el cultivo inmediatamente, el material debe ser colocado en un medio que contenga un agente reductor como: cisteína ó thioglicolato, y conservarlos a temperatura ambiente por un lapso no mayor de 2 horas.

B.—Prepare y coloree frotos directos de cada muestra.

Mediante una coloración de Gram podemos conocer la cantidad y tipos de organismos presentes en la muestra. Puede ser útil también examinar preparaciones en fresco y extendidos teñidos para gérmenes ácido resistentes y por colorante de Giemsa. Utilice pipetas capilares para hacer los extendidos de las muestras líquidas o emplee directamente los hisopos.

Examine y anote:

- 1.—Reacción al Gram, tamaño, forma y número relativo de los organismos presentes.
- 2.—La presencia de esporas, su forma y posición en la bacteria.
- 3.—Cualquier otra característica morfológica como: ramificaciones, pseudoramificaciones, formación de cadenas, filamentos, cuerpos esféricos, ó formas granulares minutas.

C.—Inocule medios para el aislamiento primario * tan pronto como reciba las muestras:

Medios líquidos:

Use pipetas capilares para inocular los medios líquidos o semisólidos, sembrando en el fondo del tubo 1 ó 2 gotas del inóculo. Coloque una gota en cada placa y extienda para obtener colonias separadas.

Tejidos u otras muestras sólidas:

Agregue suficiente cantidad de caldo thioglicolato para emulsionar la muestra y tanta arena estéril como sea necesaria.

Triture en un mortero. Trátela como una muestra líquida

Hisopos:

Coloque el hisopo directamente en el medio líquido y utilice otro hisopo para sembrar las placas. Si es necesario una suspensión para inoculación, puede prepararla agitando suficientemente el hisopo en 2 ml. aproximadamente de caldo thioglicolato.

1.—Caliente todos los medios líquidos y semisólidos en baño de maría hirviendo por 10 minutos y enfrielos en agua antes de sembrarlos.

2.—Inocule un tubo de caldo thioglicolato y otro de caldo carne glucosado (para enriquecimiento) y 3 placas de agar sangre. Después de enfriado el caldo thioglicolato agregue 0.5 ml de suero estéril de conejo.

a.—Si se sospecha la presencia de clostridios inocule una placa de amarillo de huevo agar (EYA).

b.—Si se sospecha la existencia de una infección mixta, inocule placas con medios selectivos como: agar sangre con fenil-etil-alcohol (1) y/o agar sangre con paronomicina-vancomicina-menadiona (2). La kanamicina o neomicina pueden sustituir a la paranomicina.

3.—Incube los cultivos a 35-37° C., en la forma siguiente:

a.—Incube los medios: caldo carne glucosado y thioglicolato en jarra anaeróbica por 24 a 48 horas.

b.—Incube una placa de agar sangre en atmósfera de CO₂ (vela) y otra en aerobiosis.

c.—Incube una placa de agar sangre, otra de EYA y las placas de los medios selectivos en jarra anaeróbica por un minimum de 48 horas y de preferencia de 3 a 5 días. Para absorber la humedad de las placas utilice cajas de petri con tapas de aluminio

* Para el aislamiento de *Bacteroides melaninogenicus* añada 5.0 mg. de hemina y 0.5 mg. de menadiona (esterilizada por filtración) a cada litro de medio de aislamiento.

provistas de discos absorbentes. Muchos clostridios tienen tendencia a extenderse (swarming) en placas con exceso de humedad.

D.—Después de 24 horas de incubación examine los cultivos de enriquecimiento, si no hay crecimiento aparente, reincube los medios. Si el crecimiento es aparente:

1.—De los medios caldo carne glucosado y caldo thioglicolato haga sendas preparaciones y colorea con Gram.

2.—Con una pipeta capilar tome una muestra del fondo del tubo de cultivo y haga subcultivos:

a.—Inocule 3 placas de agar sangre por cada caldo thioglicolato o caldo carne glucosado.

(1) Si se sospecha la presencia de clostridios inocule una placa de EYA (3).

(2) Si hay infección mixta inocule placas con medios selectivos.

b.—Incube las placas en anaerobiosis y aerobiosis como se describió en la sección C-3.

3.—Reincube los medios de enriquecimiento si los organismos observados en los trotes directos no han crecido en los cultivos.

E.—Después de la incubación:

1.—Examine las placas aerobicas, anaerobicas y las de CO₂ con lupa o microscopio de disección.

a.—Observe y anote las modificaciones en agar sangre, EYA, así como también tamaño y forma de las colonias.

(1) Haga preparaciones para la comparación de las colonias de diferentes placas y tiñalas por Gram. Anote la forma y localización de las esporas si las hay.

(2) Las colonias en EYA pueden ser utilizadas para investigar las catalasas, haciendo una suspensión de una colonia en unas gotas de suero salino estéril en un porta-objetos y agregándoles una gota de (H₂O₂) al 3%. No utilice colonias de las placas de agar sangre para la prueba de las catalasas.

b.—Determine el número de tipos de colonias diferentes en las placas de anaerobiosis.

(1) Por cada colonia a transferir, caliente previamente un tubo de caldo carne glucosado y un tubo de thioglicolato en agua hirviendo por 10 minutos.

(2) Utilizando un alambre de platino con un asa pequeña o una pipeta Pasteur sellada de 22.5 mm. de largo (9"), pesque

cada colonia diferente e inocule un tubo de caldo carne y un tubo de thioglicolato. Si se sospecha de otros anaerobios además de clostridios añada 0.5 ml de suero estéril de conejo al caldo thioglicolato. El caldo carne glucosado es lo mejor para el cultivo de clostridios y el caldo thioglicolato enriquecido es más adecuado para los anaerobios no esporulados.

c.—Incube los medios de caldo carne glucosado y caldo thioglicolato en anaerobiosis por 24-48 horas.

2.—Asegúrese de tener una colonia de cada tipo morfológico observado en el frote original. Si fuera necesario, resiembre las placas para obtener colonias aisladas.

F.—Examine las placas inoculadas con los medios de enriquecimiento después del periodo de incubación. Haga subcultivo en caldo carne glucosado y thioglicolato, de cualquier tipo de colonia no aislada de las placas directas.

G.—Examine los medios de caldo carne glucosado y thioglicolato inoculados con una colonia. Inocule los medios diferenciales a partir de los cultivos puros de los organismos anaerobios.

III

DETERMINACION DE LAS CARACTERÍSTICAS DE CULTIVO Y PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

A.—La identificación de las bacterias anaerobias aisladas en cultivos puros comprende la determinación de la morfología celular, características de las colonias en agar sangre y su comportamiento en una serie de pruebas bioquímicas.

Además, los clostridios son ensayados para determinar su toxigenesis y cuando es preciso, la toxina es identificada por pruebas de neutralización.

B.—Coloración de Gram de los cultivos de 24 horas para comprobar su pureza, observe el tamaño y la forma de los organismos presentes, si hubiera esporas anote su existencia y localización.

C.—Inocule los medios diferenciales.

1.—Juego básico de medios diferenciales:

caldo carne, caldo base de fermentación, glucosa, manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, salicina, glicerol, almidón, xilosa, arabinosa, thiogel, leche-hierro, indol-nitrito (para indol), indol-nitrito (para nitritos), medio para H₂S, urea, motilidad, esculina, triple azúcar hierro agar (TSI) agar infusión en bisel y caldo thioglicolato.

A este juego básico de medios de cultivo cuando se estudian bacilos Gram positivos esporulados se añade: caldo carne glucosado y suero de Löeffler.

- 2.—Caliente todos los medios, con excepción de los tubos inclinados y el suero de Löeffler, en agua hirviendo por 10 minutos. Enfríelos en agua corriente.
 - 3.—Utilice una pipeta capilar para inocular los medios líquidos y semi-sólidos depositando una gota del cultivo en el fondo del tubo. Bote una pequeña cantidad del inóculo por arriba de la línea de punción en el momento de introducir la pipeta. Asegúrese de expulsar todo el aire de la pipeta antes de introducirla en el medio. Una pipeta puede ser utilizada para sembrar varios medios diferentes.
 - 4.—Siembre por punción el medio de Löeffler con una o dos gotas del inóculo.
 - 5.—Siembre los tubos inclinados con una gota que se coloca en el vértice del bisel. Cerciórese que la gota se deslice por la superficie del bisel y no por los bordes. Inocule los medios de esculina, colocando una gota en la superficie y haciendo luego la punción en profundidad.
 - 6.—Inocule en último lugar el medio leche hierro.
 - 7.—Coloque un papel indicador de acetato de plomo por encima del bisel del TSI.
 - 8.—Incluya un tubo no inoculado de thlogel en sus pruebas diarias como testigo para la investigación de la liquefacción de la gelatina.
 - 9.—Incube los tubos inclinados en la jarra anaeróbica y los medios diferenciales en aerobiosis a 35-37° C.
- D.—Inocule por agotamiento tres placas de agar sangre con cultivos de 24 horas para obtener colonias separadas. Si se sospecha la presencia de clostridios inocule también una placa de EYA. Incube una placa de agar sangre en aerobiosis, otra placa de agar sangre debe incubarse en atmósfera de CO₂ (vela). Incube otra placa de agar sangre y de EYA en jarra anaeróbica. Las placas en anaerobiosis deben ser incubadas por lo menos por 48 horas antes de ser examinadas.
- E.—Lectura de las placas.
- 1.—Examine las placas en aerobiosis para determinar la tolerancia al oxígeno del organismo en estudio.
 - 2.—Examine la placa de EYA para investigar la producción de lecitinasa, lipasa y enzimas proteolíticas.
 - 3.—Examine las placas de agar sangre en anaerobiosis para la producción de hemólisis y característica de las colonias.
- Las características de las colonias de los cultivos puros son muy útiles en la identificación de las bacterias anaeróbicas si son descritas con precisión. Una buena lupa de mano o un microscopio de disección son de gran valor para la inspección de las colonias. Es útil seguir un procedimiento standard para examen y descripción de las colonias, de manera que las características de los diferentes cultivos puedan ser comparadas y la descripción de una colonia pueda ser interpretada por otros observadores. A continuación enumeramos las características de las colonias que deben ser observadas y algunos de los términos más usuales que ayudan en la descripción de las colonias de las bacterias.

CUADRO N.º. I


Características y descripción de las colonias.

Medio..... Edad del cultivo Temperatura..... C
 Diámetro en mm.....
 Color
 Superficie (brillante, mate, otras)
 Densidad (opaca traslúcida, otras)
 Consistencia (butirosa, viscoide, membranosa, quebradiza, otras).....

FORMA:

puntiforme 

irregular 

circular 

rizoide 

filamentosa 


fusiforme 

ELEVACION:

plana 

pulvinada 

elevada 

umbonada 

convexa 

umbilicada 

BORDES:

continuo 

erosionado 

ondulado 

filamentoso 

lobulado 

rizado 

F.—Lectura de los medios diferenciales.

1.—Las pruebas bioquímicas son incubadas de rutina hasta por 7 días después de su inoculación. Los tubos son inspeccionados diariamente y los resultados anotados el 1ro., 2do., y al final del período de incubación. Todas las pruebas de los organismos exigentes o de crecimiento lento (fastidious), pueden ser incubados hasta por tres semanas. Otras excepciones a la rutina son las siguientes:

a.—Las reacciones para indol y nitritos son realizadas 24 horas después que se ha obtenido un crecimiento suficiente en el medio indol-nitrito. Esto sucede generalmente después de 48 horas de haber sembrado los medios. Además la base de fermentación (control) puede ser probada para el indol después que la lectura final de las pruebas bioquímicas de fermentación han sido realizadas.

b.—Las pruebas para la investigación de las catalasas en medio de agar infusión y la lectura de los medios TSI y esculina se practican generalmente a las 48 horas de su inoculación y los tubos se descartan.

c.—Los medios de thiogel y suero de Loeffler son incubados hasta por 1 mes, antes de reportar la liquefacción negativa.

d.—Ocasionalmente puede ser difícil determinar la motilidad de un organismo en medio semisólido debido a la producción de gas. En este caso la movilidad puede ser comprobada por el examen microscópico de preparaciones en fresco, de cultivos jóvenes (6 a 18 horas) en caldo con bajo contenido en carbohidratos, como caldo carne por ejemplo.

e.—Las pruebas para la producción de toxinas en caldo carne glucosado se hacen generalmente en cultivos de 24 horas. Para excepciones y métodos de prueba, consulte la sección: "Comprobación de la toxigenicidad de los clostridios, pruebas de neutralización de las toxinas y pruebas de patogenicidad".

2.—ANOTACION DE LOS RESULTADOS

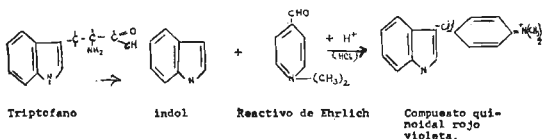
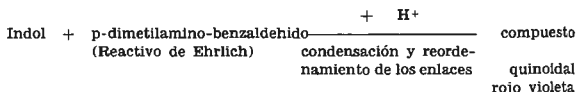
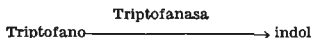
MEDIO	OBJETO	ANOTACION
a.—Caldo carne	proteolisis La digestión generalmente no aparece sino después de varios días	1 + B: Ligeramente negro en los bordes de pocas partículas 2 + B: Negro en la periferia de la mayoría de las partículas 3 + B: La $\frac{1}{2}$ de la carne ennegrecida 4 + B: Toda la carne negra H: Como hollín D: Digerida G: Gas
b.—Caldo base para fermentación	Control de los medios de fermentación	G: Gas RI: Reducción del indicador ¹
c.—Medios de fermentación	Utilización de los carbohidratos	A: Acido —: Negativo (sin cambio) () : Gas RI: Reducción del indicador ¹
d.—Thiogel	Liquefacción de la gelatina Coloque los cultivos y un control en un vaso de precipitado con agua. Llévelos a la refrigeradora. Compruebe la liquefacción tan pronto se solidifique el control.	—: No liquefacción P: Liquefacción parcial C: Liquefacción completa
e.—Leche hierro	Proteolisis Utilice placas de titulación en gotas para comprobar la acidez.	A: Acida C: Coágulo G: Gas D: Digestión N: Negro

MEDIO	OBJETO	ANOTACION
f.—Indol-nitrato	Producción de indol² Extraiga vertiendo 1 gotero lleno de xilol. Añada 1 gotero lleno de Reactivo de Ehrlich	+ : Rojo con Ehrlich — : No Rojo con Ehrlich
g.—Indol nitrato	Reducción de los nitratos³ Añada 1 gotero completo de sol.A. y ½ de sol.B. Si no hay color agregue polvo de zinc.	+ : Rojo con A + B — : No Rojo con Zinc (puede ser lento) + NO ₂ : Incoloro con Zinc
h.—H ₂ S	Producción de H₂S revelable con papel de acetato de plomo,	— : No ennegrece tr: trazas (lig. negro) + : Negro
i.—Urea	Producción de ureasa Si el indicador de rojo fenol es reducido, añada 1 gota de sol de rojo fenol al 1% el último día de incubación.	+ : Rojo oscuro — : Incoloro RI: Reducción del indicador ¹
j.—Medio movilidad	Movilidad	+ : Móvil — : Inmóvil
k.—Esculina	Hidrólisis de la esculina y producción de H ₂ S. La esculina hidrolizada no fluoresce con la luz de Wood.	+ : Pardo rojizo H ₂ S: Negro — : Sin cambio (negativo)
l.—Triple azúcar hierro agar (TSI)	pH, Gas H₂S	bisel taco papel taco A: ácido G: Gas tr: a 4 + tr: a 4 +
		B: Básico N: neutro

MEDIO	OBJETO	ANOTACION
		—: No hay producción de gas
		tr: Escasas burbujas
	Catalasa	1+: Pocas burbujas tardías
m.—tubo inclinado de infusión agar	Agregue 1 ml de H ₂ O ₂ al 3% al crecimiento del bisel. La producción de gas indica la presencia de catalasa.	2+: Número considerable de burbujas tardías
		3+: Muchas burbujas de aparición inmediata
		4+: Burbujas hasta la parte superior del tubo
n.—Thioglicolato	Medio de transporte y características de crecimiento.	G: Gas Describe crecimiento y olor
o.—caldo carne glucosado	Comprobación de toxinas solamente en Clostridios.	
	Liquefacción del suero solamente en clostridios.	
p.—Suero de Löeffler	La digestión no se observa generalmente sino a partir del 5º día.	D: Digestión

1.—Algunos clostridios pueden reducir el indicador. Si esto ocurre prepare una solución diluida de azul de bromotimol (ABT), utilizando 2 a 3 gotas de la solución acuosa al 1% de ABT por 30 ml de agua y consérvela en un frasco gotero de 30 ml. Coloque gotas de la solución diluida en las excavaciones de las placas de titulación. Con una pipeta capilar vierta unas gotas del cultivo en las excavaciones que contienen el indicador, mezcle bien y observe el color producido. Anote la reacción ácida (amarilla) o negativa (azul).

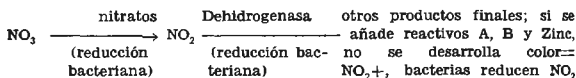
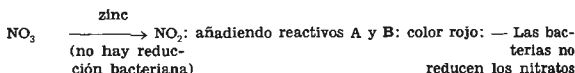
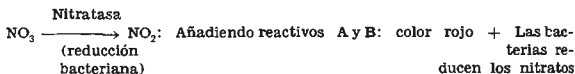
2.—La prueba para la producción de indol es un simple acoplamiento de un grupo aromático (indol) a otro (para dimetil-aminobenzaldehído) que dan un producto coloreado. El indol es generalmente formado por triptofano por la acción de una enzima: la triptofanasa.



3.—Algunas bacterias reducen los nitratos (NO₃) a nitritos (NO₂); otras reducen nitritos hasta otros productos (N₂O, NH₂OH, NH₃).

En la prueba de los nitratos la solución A (ácido sulfanílico) y la solución B (dimetil-alfa-naftilamina) son utilizadas para indicar la presencia de nitritos (NO₂ + A + B = color rojo).

Tres tipos de reacción pueden observarse:



Se adiciona glucosa al medio como dador de hidrógeno.

En los medios que contienen agar, la reducción de los nitratos por el polvo de zinc generalmente se verifica lentamente, algunas veces requiere 15 minutos o más. **Cualquier** desarrollo de color rojo después que se añade el polvo de zinc es suficiente para indicar que el "cultivo" es nitrato negativo; o sea que el zinc redujo el nitrato del medio.

**INVESTIGACION DE LAS TOXINAS DE LOS CLOSTRIDIOS
PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE LAS TOXINAS Y
PRUEBAS DE PATOGENICIDAD**

A.—Pruebas para las toxinas de los clostridios.

- 1.—Todos los cultivos de los **Clostridios** son probados de rutina para la investigación de la producción de toxinas. Aunque las condiciones para la elaboración de toxinas varía con cada especie, las toxinas de los clostridios son generalmente reveladas en cultivos en caldo carne glucosado incubados por 18 horas a 35-37° centígrados.

Si se sospecha la presencia de **C. novyi A**, debe emplearse medio de caldo carne sin dextrosa (4), (5). Los cultivos con probabilidad de ser **C. botulinum** o **C. sporogenes** deben cultivarse en medio de carne-dextrosa-almadón e incubarse a 30°C (vea páginas relativas al examen de alimentos para **C. botulinum** y sus toxinas). (6).

Debe tenerse en cuenta la edad de los cultivos. Algunos clostridios, como por ejemplo: **C. perfringens**, **C. histolyticum** y **C. hemolyticum** son más tóxicos en cultivos jóvenes y otros como por ejemplo:

C. botulinum, **C. novyi** y **C. tetani**, presentan su máximo de toxicidad después de varios días de incubación. (4, 5).

- 2.—Haga las pruebas de toxicidad de rutina en caldo carne dextrosa cultivados por 18 horas a temperatura de 35-37°C.

a.—Con pipeta transfiera 3.0 ml del sobrenadante del cultivo a un tubo de centrifuga plástico de 12 ml.

b.—Centrifugelo a 10.000 RPM por 10 minutos. Decante el líquido sobrenadante en un tubo limpio.

c.—Llene una inyectadora de 1.0 ml. con 8.8 ml del cultivo centrifugado e inocule 2 ratones de 15 a 20 gramos de peso por vía intra-peritoneal con 0.4 ml cada uno.

d.—Observe los ratones hasta por 3 días. Los cultivos de clostridios tóxicos generalmente matan al ratón dentro de las 24 horas siguientes a la inoculación.

e.—La posibilidad de necesitar pruebas futuras de toxinogenia empleando medios especiales, condiciones de cultivo o procedimientos de inoculación, dependerá del resultado total de los cultivos, pruebas bioquímicas y las de toxicidad de rutina.

B.—Identificación de toxinas específicas de los clostridios.

- 1.—Cuando se ha comprobado que el líquido de cultivo de un **clostridio** es tóxico para el ratón es a menudo útil en la identificación del organismo realizar pruebas de protección en el animal utilizando sueros inmuno-específicos. La neutralización de un líquido tóxico es generalmente realizada mezclando 1.2 ml de cultivo líquido centrifugado con 0.3 ml de antitoxina específica, dejando permanecer la muestra por 30 minutos a 37°C y luego inoculando 2 ratones, cada uno con 0,5 ml del material por vía I. P.
- 2.—Los antisueros para **Clostridios** que se consiguen en el comercio son los siguientes:

C. perfringens tipos A, B, C, D y E.

C. novyi tipos A y B.

C. chauvoei

C. tetani

C. botulinum tipos A, B, C, D, E y F.

C.—Pruebas de patogenicidad.

- 1.—La determinación de las propiedades patógenas de una bacteria anaeróbica es bastante útil en la evaluación del papel que un organismo pueda jugar en un proceso patológico. El tipo de animal de laboratorio empleado y las condiciones requeridas para la demostración de la patogenicidad son muy variables y dependen de la especie a ensayar.
- 2.—Los cultivos de los **Clostridios** son probados de rutina para su patogenicidad inoculando un cobayo por vía I. M. en el muslo con 0.5 ml de una mezcla que contenga partes iguales de un cultivo en caldo carne dextrosa de 18 horas y solución de cloruro de calcio al 10%.
- 3.—La acción patógena de los cultivos de los **Clostridios** en los cobayos después de una inyección es muy variada y puede ocasionar:

1.—edema hemorrágico o gelatinoso, 2.—bolsa de gas en el tejido infectado, 3.—necrosis, 4.—digestión del tejido muscular, 5.—muerte rápida por intoxicación con pocos cambios patológicos visibles, 6.—parálisis y/o espasmos musculares tóxicos (4, 5). Los cambios patológicos generalmente aparecen dentro de un período de 4 a 5 días, sin embargo, los cobayos deben ser mantenidos en observación por un período de dos semanas antes que los cultivos sean reportados como no patógenos.

V

TIPAJE DE LA TOXINA DE CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

A.—La mayoría de las infecciones humanas o intoxicaciones por *C. perfringens* son debidas a cepas del tipo A. Las cepas de los tipos A, B, C, D y E son responsables de una variedad de enfermedades en los animales. Las cepas del tipo A producen una toxina alfa letal y todos los otros tipos producen al menos una toxina letal mayor además de la toxina alfa. La diferenciación de los tipos está en la revelación y neutralización de las toxinas en los centrifugados de los cultivos en medios líquidos. Las pruebas de toxicidad y seroneutralización para tipificación son realizadas en ratones.

Los tipos de *C. perfringens* se caracterizan por la producción de una o más de las toxinas letales siguientes

Tipo	A	B	C	D	E
Tipo	α	$\alpha \beta \epsilon$	$\alpha \beta$	$\alpha \epsilon$	$\alpha \epsilon$

Las toxinas epsilon-iota son activadas por la tripsina. (7).

Las toxinas alfa y beta son inactivadas por la tripsina.

B.—Preparación del centrifugado de cultivos líquidos (CCL).

- 1.—Utilice cultivos de caldo carne almidón de 6 a 16 horas (no más viejos).
- 2.—Centrifuge los cultivos líquidos en tubos de centrifuga de polietileno a 10.000 RPM (preferiblemente a baja temperatura) por 10 minutos.
- 3.—Vierta el CCL en tubos de 15 x 125 mm.
- 4.—Para la tripsinización mezcle una parte de solución de tripsina al 1% y 9 partes de CCL en tubos de 15 x 125 mm e incube la mezcla por 30 minutos en baño maría a 37°C.

C.—Determinación de la toxicidad

- 1.—Inocule ratones con 0.5 ml cada uno por vía I. P. con CCL no tratado.
- 2.—Inocule 2 ratones con 0.5 ml cada uno por vía I. P. con CCL tripsinizado.
- 3.—Observe los ratones por 48 horas. Las cepas del tipo A generalmente matan al ratón dentro de las 18 horas después de la inoculación.

D.—Pruebas de sero-neutralización.

- 1.—Cuando trabaje con gérmenes tóxicos aislados de material humano el procedimiento de rutina para la neutralización consiste en probar con el antisuero tipo A y un control con suero normal de conejo (SNC). Esta prueba incluye los tubos 1, 2, 5 y 6 de la tabla N° II. Si los ratones inoculados con ambas muestras tripsinizadas y no tripsinizadas neutralizadas con antisuero A no mueren, el cultivo es reportado como no perteneciente al grupo A.

Si ocurre la muerte, el CCL es probado con antisueros de los tipos restantes de *C. perfringens*.

- 2.—En un tubo de 12 x 75 mm mezcle 1.2 de CCL o CCL tripsinizado con 0.3 ml del tipo específico de antisuero de *C. perfringens* (tipos A, B, C, D o E) o suero normal de conejo (SNC) como se muestra en el cuadro N° II.
- 3.—Incube la muestra CCL-antisuero por 30 minutos en baño de agua a 37°C e inocule 2 ratones por vía IP con cada muestra.

C U A D R O I I

PRUEBAS DE NEUTRALIZACION DE TOXINAS DEL *C. PERFRINGENS* EN
RATONES UTILIZANDO SOBRENADANTES DE CULTIVOS CENTRIFUGADOS

Tubos	Mezcla inyectada	Letalidad para el ratón con <i>C. perfringens</i> tipo				
		A	B	C	D	E
1	CCL NO TRATADO + SUERO NORMAL DE CONEJO	+	+	+	+	+
2	CCL NO TRATADO + ANTI A (anti alpha)	-	+	+	*-	±
3	CCL NO TRATADO + ANTI C (anti alpha + anti beta)	-	*-	-	*-	±
4	CCL NO TRATADO + ANTI B (anti alpha antiβ + antiε)	-	-	-	-	±
5	CCL Tripsinizado + SUERO NORMAL DE CONEJO	±	+	*-	+	+
6	CCL Tripsinizado + ANTI (anti alpha)	-	+	*-	+	+
7	CCL Tripsinizado + ANTI D (anti alpha + anti-epsilon)	-	*-	**	-	+
8	CCL Tripsinizado + ANTI B antiα + antiβ + antiε)	-	-	-	-	+
9	CCL Tripsinizado + ANTI E (anti alpha + anti iota)	-	+	*-	+	-
	Toxina identificada	α	β+ε	β	ε	ι

* Generalmente negativa, la toxina epsilon se encuentra en forma de protixina

** Generalmente negativa, la toxina beta es destruida por la tripsina.

VI

AGLUTINACION DEL CORYNEBACTERIUM ACNES

A.—El antígeno para la prueba se prepara con cultivos de 48 horas en tubos inclinados de corazón-infusión-dextrosa-agar.

1.—Suspenda el crecimiento de cada tubo inclinado en 1.0 ml de solución salina al 0.85% formolizada al 0.4%.

2.—Con una pipeta capilar que tenga enrollada en su punta una fina capa de algodón no absorbente, filtre la suspensión al través del algodón mientras llena la pipeta. Coloque la suspensión filtrada en tubos con tapa de rosca de 13 x 100 mm.

B.—Un antígeno de *Corynebacterium acnes* y el antígeno a probar deben ser controlados con dos antisueros de *Corynebacterium acnes* (Nº 554 y Nº. 605 NCDC) y con suero normal de conejo en cada investigación que se haga.

C.—Prueba de aglutinación en lámina.

1.—Con lápiz graso, marque la lámina de modo que quede dividida en tres partes iguales.

2.—Coloque una (I) gota de cada suero diferente cerca del borde distal de un área. Agrégue una (I) gota de antígeno en cada área y cerca del borde próximo al operador. Mezcle los reactivos inclinando la lámina.

3.—Anote los resultados así:

Negativo: No hay aglutinación

1 + : 25 % de organismos aglutinados

2 + : 50 % " " "

3 + : 75 % " " "

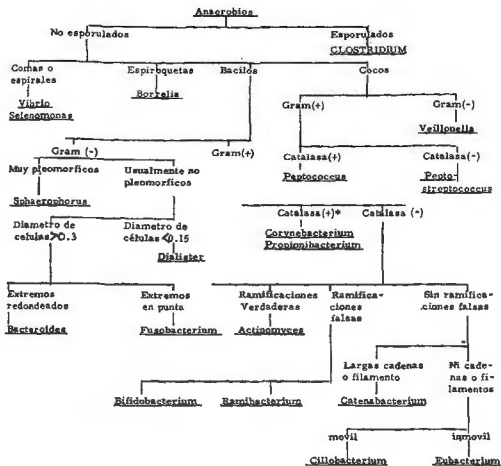
4 + : 100 % " " "

NOTA: La mayoría de las cepas de *C. acnes* son aglutinadas fuertemente por uno o ambos antisueros específicos. Además otros *Corynebacterium* (*Propionibacterium*) anaerobios íntimamente relacionados también pueden ser aglutinados.

**LLAVES PARA LA IDENTIFICACION
DE BACTERIAS ANAEROBICAS**

DIAGRAMA I

**DIFERENCIACION PRIMARIA DE BACTERIAS
ANAEROBICAS HASTA NIVEL DEL GENERO**



* Algunas cepas con catalasa negativa

CUADRO III
 LLAVE DICOTOMICA PARA LA IDENTIFICACION DE LOS CLOSTRIDIOS
 ENCONTRADOS CON MAYOR FRECUENCIA

Glucosa	Manitol	Lactosa	Indol	Sacarosa	Movilidad	Crecimiento aerobico	Almidón	Glicerol	Leche	Reducción de nitratos	Esporas	Gelatina	Indol	Ureasa	Toxicidad	Hemólisis	ESPECIES
A	A	A	+														sphenoides
			-				+										tertium
																	butyricum
																	innocuum
																	difficile
																	sphenoides
																	carnis
																	paraputrificum
																	fallax
																	chauvoet
																	pereringens
																	septicum
																	aerofaecium
																	sordellii
																	bifermentans
																	botulinum ABF
																	sporogenes
																	novyi
																	capitovale
																	haemolyticum
																	botulinum BCDE
																	tetanomorphum
																	histolyticum
																	tetani
																	lentoputrescens
																	subterminale
																	cochlearium

los sentimientos son mutuos...

Un día llega la comprensión. Entonces el cariño. Así se crea la cálida relación entre la niña y su hermanito.

Como guardián de la salud familiar, el médico tiene un interés personal en el bienestar de ambos. Mead Johnson comparte con él este interés.

En prácticamente todos los aspectos de la nutrición pediátrica, el nombre de Mead Johnson se ha hecho sinónimo de fórmulas idóneas de alta calidad. Hay un producto Mead Johnson prácticamente para todas las necesidades nutritivas. Esto incluye fórmulas lácteas para niños alérgicos y para los que necesitan alimentación terapéutica. Para jóvenes de todas las edades hay cereales, vitaminas, preparados vitamínico-minerales, y hematínicos, Mead Johnson.

El verdadero prestigio solo se alcanza por los merecimientos de largos años de experiencia y aceptación. Es esta clase de aceptación duradera que caracteriza la línea Mead Johnson de productos pediátricos.



Mead Johnson

Símbolo de servicio en medicina

MEAD JOHNSON PHARMACEUTICALS LTD. CARACAS VENEZUELA



SUSTAGEN

Alimento terapéutico completo

para proporcionar **todos** o parte de los
requerimientos nutritivos del paciente,
en alimentación por vía **oral**
o por **sonda**

Convalecencia
Anorexia
Desnutrición
Úlcera Péptica
Pre y Post
Operatorio
Fracturas
Cirugía Oral
y Dental
Quemaduras
Pérdida de Peso
Astenia
Kwashiorkor
Náusea
y vómito
del Embarazo



Mead Johnson

Símbolo de servicio en

MEAD JOHNSON INTERNATIONAL, LTD. - CARACAS, VENEZUELA

**CARACTERÍSTICAS DE LAS ESPECIES DE CLOSTRIDIOS
ENCONTRADOS CON MAYOR FRECUENCIA.**

ESPECIES	Hemólisis					Substratos					H ₂ S	Indol	Movilidad	Esporas	Virulencia	Patogenicidad										
	Stemática	Lectinasa	Lipasa	Ureasa	Catalasa	Cr. Aeróbico	Gelatina	Leche	Carnic	Suero							Glucosa	Mantol	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Almidón		
aerofotidum ^a	-	-	-	-	-	D	AC (B)	BD	D	D	A	-	A	-	A	A	-	-	-	+	-	+	OST	-	sl	
bifermentans	+	+	-	-	-	D	D	B	(D)	-	A	-	-	-	A	v	A ⁻	-	1/2	+	-	+	+	OST	-	-
botulinum ABF	+	sm	+	-	-	D	BD	BD	D	D	A	-	-	v	A	v	v	-	4/4	+	-	-	+	OST	+	-
botulinum BCDE	+	sm	+	-	-	D	A	-	-	-	A	-	-	v	v	v	v	-	1/-	-	-	-	+	OST	+	-
butyricum	-	-	-	-	-	-	AGC	-	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	-	-	-	-	+	OST	-	-
capitovale	-	+	-	-	-	D ⁺	A (C)	B	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	4/4	+	-	+	+	OT	-	+
carnis ^a	-	+	-	-	-	-	A	-	-	-	A	-	A	A	A	A	-	v	1/-	-	-	-	+	OST	?	+
cochlearium ^a	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	OT	-	-
difficile	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	A	A	-	-	-	A	-	-	2/-	tr	-	-	+	OST	v	+
fallax ^a	v	-	-	-	-	-	A (G)	P	-	-	A	-	A	A	A	A	-	A	-	-	-	-	+	OST	sl	v
chauvoei	+	-	-	-	-	D ⁺	A (G)	G	-	-	A	-	A	A ⁻	A	(A)	-	-	2/-	-	+	-	+	OST	+	+
haemolyticum	+	+	-	-	-	D	A	-	-	-	A	-	-	-	-	-	-	-	1/-	-	+	+	+	OST	+	+
histolyticum	+	-	-	-	-	D	C (B)	ED	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	2/-	tr	-	-	+	OST	sl	+
innocuum	+	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A	A	-	v	A	A	-	-	1/-	v	-	-	-	OT	-	-
lentoputrescens ^a	+	-	-	-	-	D	C (DB)	-	D	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	RT	-	-

CUADRO IV

ESPECIES	Hemolisis			Gelatina			Almidón							H ₂ S	Nitrate reduc.	Movilidad	Esporas	Toxicidad	Patogenicidad
	Lecitinas Lipasa	Urea Catalasa	Cr. Aeróbico	Leche	Carne	Suero	Glucosa	Maltosa	Lactosa	Sacarosa	Maltosa	Salicina	Glicerol						
novyi A	+	+	-	A D (CC)	G (B)	-	A	-	-	-	(A)	-	A	4/4 +	+ - +	CST	+ +		
novyi B	+	+	-	A D (D)	G	-	A	-	-	-	-	-	A	4/4 +	+ - +	CST	+ +		
paraputrificum	- [§]	-	-	A (CC)	-	-	A	-	A	A	A	-	A	4/-	- v - +	OT	- -		
perfringens	+	+	-	D ⁺ ST	B ⁺	-	A	-	A	A	A	v	A ⁺ A	4/-	+ + - -	CST	+ ⁺ +		
Septicum	+	-	-	A D (CC)	G	-	A	-	A	-	A	-	A ⁻ A ⁻	2/-	- v - +	CST	+ +		
ordalii	+	+	-	D BD	BD	-	A	-	-	-	A	-	A	3/2 +	- + +	CST	v v		
sphaeroides [§]	+	-	-	A (CC)	-	-	A	v	A	v	A	A	-	v	+ + +	RT	-		
sporogaeus	+	+	-	D BD	BD	D ⁺	A	-	-	v	A	v	v	4/4 +	- - +	CST	- -		
subterminale	+ ⁺	-	-	A D (CB)	BD	D ⁺	-	-	-	-	-	-	-	4/A +	- - +	CST	- -		
tertium	-	-	+	A (CC)	G	-	A	A	A	A	A	-	A	2/-	v 4 ⁺ - +	OT	- -		
trial	+	-	-	D	A	v	-	-	-	-	-	-	-	4/A	- + ⁺ + ⁻	RT	+ +		
litanomorphum	+	-	-	D	-	-	A	-	-	-	A	-	-	-	- - +	RT	-		

A: Acido -: Reaccion negativa O: oval (): Reaccion tardía o variable C: Coagulo G: gas
D: digestión +: Reaccion positiva R: redonda Superscritos: reacciones ocasionales el: débilmente +
T: terminal v: variable ST: subterminal §: Descripción basada en la literatura consultada y no del NCDC.

C U A D R O V

**CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO
DE BACILOS ANAEROBICOS NO ESPORULADOS**

ESPECIES	GRAM	MORFOLOGIA	
		CELULAR	COLONIAL
<i>C. acnes</i>	+	Bacilos pleomórficos, pequeños, granos en rosario, formas en porra (thioglicolato, AS)	Gotas de rocío, blancas convexas, borde continuo, opacas, lustrosas
<i>B. fragilis</i>	-	Bacilos regulares con extremos romos, pueden ser pleomórficos (AS), usualmente vacuolados (thioglicolato).	Moteadas, circulares, borde continuo, lustrosas.
<i>B. variabilis</i>	-	Bacilos pequeños con extremos romos (AS) vacuolados (thioglicolato).	Circulares, borde continuo, lustrosas, opacas con periferia translúcida.
<i>B. terebrans</i>	-	Bacilos pequeños con extremos romos (AS), delgados con extremos romos, usualmente filamentosos, algunos en cadena (thioglicolato).	Circulares, borde continuo, translúcidas, elevadas hasta ligeramente convexas.
<i>B. melaninogenicus</i>	-	Formas cocoides (AS) bacilos pleomórficos, vacuolados, degenerados (thioglicolato).	Colonias negras en AS después de 4 a 5 días de incubación.
<i>S. necrophorus</i>	-	Bacilos pleomórficos con extremos romos, esférulas y cuerpos circulares (AS y thioglicolato).	Umbonadas, opacas con periferia translúcida, circulares.
<i>F. fusiforme</i>	-	Bacilos delgados con extremos puntiagudos, algunos o la mayoría con formas filamentosas (AS y thioglicolato)	Circulares, borde continuo, lustrosas, ligeramente convexas, translúcidas, a menudo con tinte verdoso, moteadas.
<i>F. girans</i>	-	Husos pequeños o medianos, generalmente en pares (AS thioglicolato).	Poco convexas, ligeramente irregulares, moteadas, opacas.

CUADRO VI

CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO DE BACILOS
ANAEROBICOS GRAM NEGATIVOS NO ESPORULADOS

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasa	Producción de Leche	Gelatina	Nitritos	Indol	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Almidón	Esculina (Hidrolisis)	OTROS	
<i>Bacteroides corvipes</i>	AN	-	V	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Colonias hundidas formando hoyos en agar sangre.	
<i>Bacteroides fragilis</i>	AN	V	+	ACG ^A	-	-	A	-	A ²	A ²	A ²	-	-	A	A	-	A ²	+	Mayoría de cepas encapsuladas	
<i>Bacteroides incomptus</i>	AN	-	V	ACG ^A	-	-	A	-	A	A	A	- ^A	-	A	A	A	A	+	Mayoría de cepas encapsuladas	
<i>Bacteroides melaninogenicus</i>	AN	-	+	D	+	+	A	-	V	V	V	-	V	V	-	-	V	V	Colonias negras en agar sangre. Requieren hemina. Mayoría requieren Vit. K.	
<i>Bacteroides oralis</i>	AN	- ⁺	V	ACG	-	-	A	-	A	A	A	- ^A	-	A	-	-	A ⁺	+	+	
<i>Bacteroides terebrans</i>	AN	-	-	A	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	-	-	-	-	+	
<i>Bacteroides variabilis</i>	AN	V	+	ACG	-	+	A	-	A ²	A ²	A ²	-	-	A	V	V	A ⁺	+	+	Generalmente encapsuladas

AN: Anaerobico
F : facultativo
D: digestión

N: microaerofílico
V: variable

A: Amarillo con azul de bromotimol (Acido)
a: verde con azul de bromotimol (ácido debil)
Soprescritos: reacciones ocasionales

C: coagulada d: digestión ligera
G: gas

CUADRO VI (continuación)

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasas	Prod. de gas	Leche	Gelatina	Nitritos	Indol	Glucosa	Manitol	Lactosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Almidón	Esculina (Hidrolisis)	OTROS	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F1)	AN	-	V	o A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigentes	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F2)	AN	-tr	-tr	A	+ +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigentes	
<u>Bacteroides</u> Species (NCDC grupo F3)	AN	-	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Exigente, colonias muy planas y exten- sivas	
<u>Fusobacterium</u> <u>fusiforme</u>	AN	-tr	V	-	-	-	+	A o s	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	
<u>Fusobacterium</u> <u>grans</u>	AN	-tr	V	AC ^A	- ^d	-	-	A	-	A ⁻	A	A	A ⁻	-	A	A	A	-	-	+	Moviles
<u>Sphaerophorus</u> <u>neurophorus</u>	AN	-	V	o A	-	-	+	A	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-	-	Muy pleomórficos

AN: anaerobico

M: microaerofílico

A: amarillo con azul de bromotil (Acido)

C: Coagulada d: digestión

F: facultativo

V: variable

a: verde con azul de bromotimol (ácido débil)

G: gas

D: digestión

Superscritos; reacciones ocasionales.

CUADRO VII

**CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO
DE COCOS ANAEROBICOS**

ESPECIES	Relación O ₂	Catalasas	Prod. de gas	Leche	Gelatin	Nitrato	Inulín	Citocosa	Mantol	Loctosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glucero	Fructosa	Xilosa	Arabinosa	Ac. Aímido	Hid.	Esculina (hidrólisis)	OTROS	
<u>Pentococcus</u> (NCDC grupo 1)	AN	+	V	-	-	-	V	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + masas irregulares.	
<u>Pentococcus</u> (NCDC grupo 2)	AN	+	-	δ A	-	+	-	A	-	-	-	-	A	-	A	-	-	-	-	-	Cocos Gram + masas irregulares.	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 1)	AN	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + pares, cadenas	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 2)	AN	-	V	-δ δ A	-	d +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + pares cadenas (alg. pleomórficos)	
<u>Peptostreptococcus</u> (NCDC grupo 3)	AN	-	V	V	-	V	-	A	-	V	A	-	A	-	A	-	-	-	A	-	+	Cocos Gram + es pares, cadenas, (Algunos pleomórficos)
<u>Serratia</u> Species	AN	-	V	-δ A	-	d	-	+	a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram + grandes masas tridimensionales.	
<u>Veillonella</u> <u>alcaligena</u>	AN	+	V	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Pequeños Cocos Gram - pares, cadenas cortas y masas irregulares.	
<u>Veillonella</u> <u>parvula</u>	AN	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Cocos Gram - pequeños, pares, cadenas pequeñas y masas irregulares.	

AN- anaerobico Mx microaerofílico As amarillo con azul de bromotimol (Acido) C= coagulado d- digestión ligera
 F- facultativo V- variable + verde con azul de bromotimol (Acido débil) D= digestión G= gas
 Superocritas reacciones ocasionales

CUADRO VIII

CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LOS CULTIVOS DE ACTINOMYCES

ESPECIES	Crecimiento en caldo thioglicolato	Morfología microscópica de cultivos en caldo thioglicolato	Morfología de las colonias en caldo cerebro infusión agar, después de 24-48 hrs a 37°C (colonias jóvenes)	Morfología de las colonias en cerebro corazón infusión agar después de 7-10 días de incubación a 37° C (colonias maduras)
<u>Actinomyces boydii</u>	Difuso	Usualmente difteróide.	Planas, granulosa, completas (rara vez colonias de araña)	Lisa, completa, (rara vez rugosa)
<u>Actinomyces israelii</u>	Granuloso, caldo claro, (rara vez difuso)	filamentoso, ramificado (raras veces difteróide)	"Colonias araña" raras veces planas, granulosa, enteras)	"como nueces, (raras veces lisas)
<u>Actinomyces naeblandii</u>	Difuso o granular	"Difteróides" o filamentosos	"colonias araña" o lisas enteras.	rugosa o lisas
<u>Actinomyces odontolevus</u>	difuso	"difteróides"	Planas, granulares, enteras.	lisas
<u>Actinomyces propionicus</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>	Igual al <u>A. israelii</u>
<u>Actinomyces rickiae</u>	difuso	"Difteróide" o filamentosos, ramificado o bifurcado.	Plana, granulosa, entera.	Lisa con periferia con festones o flecos.

Las reacciones para las especies de Actinomyces están basadas principalmente en datos de la Unidad de Micología Sección de Micología, - NCDC - Cortesía de la Dra. Lucille George.

CUADRO IX

CARACTERÍSTICAS DE UN GRUPO REPRESENTATIVO DE
BACILOS ANAEROBICOS GRAM POSITIVOS NO ESPORULADOS

ESPECIES	Reacción Oz	Catalasa	Prod. de Gas	Leche	Gelatina	Nitrógeno	Indol	Glucosa	Mantol	Lectosa	Sucrosa	Maltosa	Salicina	Glicerol	Xilosa	Arabinosa	AC	Hil	Almidón	Etilcelulosa (Hidrolisis)	OTROS
<i>Actinomyces bovis</i>	M δ AN	-	-	A	d	+	-	A	-	A	V	V	+	+	(tardío) V	-	A	+	+		Aislados solamente de material animal
<i>Actinomyces israelii</i>	M or AN	-	-	δ	d	+	-	A	V	A	Δ	A	A	-	A	A	V	-	+		
<i>Actinomyces nassalundii</i>	F	-	-	A δ ACD	-	V	-	A	-	+	A	A	V	V	-	-	+	-	V		Crece más rápidamente que otros <i>Actinomyces</i>
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	M δ AN	-	-	+	-	+	-	A	-	V	V	V	-	+	V	V	A	+	+		Colonias rojas en agar sangre (3 a 5 días)
<i>Actinomyces propionicus</i>	M δ AN	-	-	+	-	+	-	A	A	A	A	A	-	-	-	-	+	-	-		
<i>Actinomyces griffithii</i>	AN	-	V	δ AC ACD	-	-	-	A	A	A	A	A	A	-	A	A	A	+	V		
<i>Bifidobacterium species</i>	AN	-	V	AC	-	-	-	A	V	A	A	A	V	-	A	V	V	V	V		Pleomórficas, ramificaciones, extremos bifurcados
<i>Bifidobacterium cornutum</i>	AN	+	V	δ A	-	-	-	V	-	-	-	V	-	-	V	-	-	-	-		Pleomórficas, ramificadas, puntas bifurcadas

AN: anaerobico

M: microaerofílico

A: Amarillo con azul de bromotimol (Acido)

C: coagulado

d: digestión ligera

F: facultativo

V: variable

a: verde con azul de bromotimol (acido débil)

D: digestión

G: gas

Suprescritos: reacciones ocasionales.

VIII

EXAMEN DE LOS ALIMENTOS PARA INVESTIGACION DE *C. BOTULINUM* Y DEMOSTRACION DE LAS TOXINAS BOTULINICAS EN ALIMENTOS Y SUERO SANGUINEO.

A.—Seis tipos toxigénicos de *C. botulinum* han sido reconocidos en base a las seis toxinas antigenicamente distintas, producidas por diferentes cepas del mismo organismo. Los casos de botulismo humano son generalmente producidos por los tipos A, B, E y F.

Los tipos C y D son generalmente los causantes de brotes de botulismo en pájaros y otros animales (4, 5, 6). El medio más efectivo para el diagnóstico de botulismo en el laboratorio es la identificación de la toxina específica en el suero sanguíneo del paciente (15). Un diagnóstico de laboratorio indirecto puede ser realizado por la demostración de la presencia de toxinas en los extractos de alimentos incriminados como causa de la intoxicación. También es útil aislar el agente causal de muestras de alimentos y confirmar el tipo por pruebas de neutralización en el ratón.

Para descubrir la toxina de *C. botulinum* en muestras de alimentos, tales como carne, pescado, etc. es necesario extraer la toxina con un diluyente adecuado. Porciones líquidas de alimentos enlatados, extractos o cultivos en medio líquido son centrifugados antes de la prueba. Los productos así clarificados, son inoculados al ratón y si se revela la presencia de alguna toxina, ésta es específicamente identificada por neutralización con antitoxina tipo específico. La toxicidad de las toxinas de *C. botulinum* tipo E y de cepas no proteolíticas de *C. botulinum* B y F pueden ser considerablemente aumentadas por la adición de tripsina, (16, 17). Por esta razón la demostración de la toxina y la neutralización en el ratón deben ser realizadas con material tripsinizado así como no tripsinizado. Las muestras de suero no requieren ser tripsinizadas para activar las toxinas. (15).

B.—Preparación del extracto de alimento.

- 1.—Anote toda información que identifique la muestra de alimento.
- 2.—Si se trata de alimentos enlatados, limpie bien la tapa con alcohol al 70%. Antes de abrirla y con el fin de evitar los aerosoles, coloque la lata en una bolsa de plástico adecuada al tamaño del envase.
- 3.—Anote las condiciones del alimento (gaseoso, oscuro, pútrido, etc.).
- 4.—Triture el alimento en un mortero frío, estéril (prepesado).
 - a.—Coloque el alimento en el mortero, péselo y anote la cantidad de alimento utilizado. Si se dispone de suficiente material, 50 gramos es una cantidad adecuada para la investigación.
 - b.—Aguague 1 ó 2 gramos de arena estéril.

c.—Añada una pequeña cantidad (5 ml) del diluyente de gelatina previamente enfriado y triture con mazo estéril para obtener una suspensión homogénea. En algunos casos, cuando el alimento está extremadamente seco, puede ser necesario agregar diluyente-gelatina adicional de manera de poder triturar la muestra.

d.—Después de la trituración, agregue diluyente suficiente para alcanzar un volumen de diluyente igual a los gramos de alimento empleado (V/P).

5.—Haga un frote y tíñalo con Gram. Anote: tamaño de los bacilos, número aproximado y tipo de organismos existentes, presencia y localización de esporas.

C.—Cultivo de una muestra de alimento.

1.—Tratamiento por el alcohol.

a.—Utilizando una pipeta de seguridad (Pro-Pipette) o una pipeta, capilar con la punta rota, vierta aproximadamente 0,5 ml de la suspensión de alimento en un tubo estéril de 13 x 100 mm. con tapa de rosca.

b.—Agregue un volumen igual de alcohol absoluto e incube a temperatura ambiente por una hora, mezclando con intervalos de 15 minutos aproximadamente. El tratamiento por el alcohol mata las bacterias pero las esporas permanecen viables. (6).

2.—Caliente 5 tubos de caldo carne-dextrosa-almidón en agua hirviendo por 10 minutos. Transfiera 3 tubos a un baño de agua a 70°C. y enfríe los 2 tubos restantes en agua corriente.

3.—Inocule uno de los dos tubos enfriados de caldo-carne-dextrosa-almidón con suspensión de alimento no tratado y el segundo con la suspensión tratada por el alcohol. Con una pipeta capilar inocule el fondo del tubo con 0.5 a 1.0 ml. Evite la introducción de burbujas de aire en el medio durante la siembra.

4.—Después de equilibrar la temperatura, inocule los 3 tubos de caldo-carne-dextrosa-almidón en baño de agua a 70° C. Anote el tiempo de inmersión; a los 10 minutos traslade un tubo a agua fría, los 2 restantes llévelos a baño de agua a 80° C por 10 minutos, antes de enfriar. Después de 10 minutos a 80° C, enfríe un tubo y coloque el tubo restante en agua hirviendo por 10 minutos adicionales antes de enfriar.

5.—Incube el medio de caldo-carne-dextrosa-almidón en una jarra anaerótica a 30° C. Algunos tipos de *C. botulinum* producen poca o ninguna toxina por encima de 30° C. (17). La producción máxima de toxina ocurre generalmente después de 3 a 5 días de incubación (6).

6.—Aislamiento e identificación.

Para obtener cultivos puros de *C. botulinum*, subcultive del medio carne-dextrosa-almidón a placas de agar sangre y EYA.

Siempre de manera de obtener colonias aisladas. Incube las placas en jarras anaerobias a 35-37° C. Por 48 horas. Transfiera las colonias aisladas a tubos de caldo-carne-dextrosa-almidón e incúbelas a 30° C. Establezca la identidad de los cultivos puros empleando los procedimientos convencionales de cultivo, bioquímicos y el tipaje de la toxina por medio de pruebas de neutralización en el ratón.

D.—Tipaje de la toxina de *C. botulinum* en alimentos o cultivos.

1.—Clarificación.

a.—Suspensión de alimentos. Exprima en el mortero las partículas de alimento y vierta la suspensión en un tubo plástico adecuado a la centrifugación.

b.—Cultivos.

Vierta la porción líquida de los tubos de caldo -carne-dextrosa-almidón incubados a 30° C. a un tubo plástico de centrifuga.

c.—Centrifugue la suspensión de los alimentos o cultivos líquidos a 10.000 RPM. por 10 minutos (preferiblemente en centrifuga refrigerada). En la centrifugación también puede emplearse una velocidad menor por tiempo mayor.

d.—Vierta el sobrenadante en tubos de 15 x 125 mm. para reacciones. En algunos casos es necesario clarificar con una segunda centrifugación.

2.—Tripsinización.

Mezcle 4.5 ml. de extracto de alimento o cultivo líquido con 0.5 ml. de solución de tripsina al 1% e incúbela a 37° C. por 45 minutos.

3.—Inoculación al ratón.

a.—Rotule 11 tubos (15 x 85 mm) y prepare las mezclas según la tabla número X.

C U A D R O X

INVESTIGACION DE LAS TOXINAS DE *C. botulinum* EN EXTRACTOS DE ALIMENTOS O CULTIVOS EN MEDIO LIQUIDO

Tubo N°.	extractos o cultivo liquido	Suero o antitoxina	Tratamiento
1	1.2 ml puro	0.3 ml SNC*	37°C por 30'
2	1.2 ml puro	0.3 ml SNC después de calentado y enfriado	Tapar el tubo con algodón. Hervir en agua por 10 minutos
3	1.2 ml puro	0.3 ml anti-A	37°C por 30'
4	1.2 ml puro	0.3 ml anti-B	37°C por 30'
5	1.2 ml puro	0.3 ml anti-E	37°C por 30'
6	1.2 ml puro	0.3 ml anti-F	37°C por 30'
7	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml SNC	37°C por 30'
8	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml SNC después de calentado y enfriado	Tapar el tubo con algodón. Hervir en agua por 10 minutos
9	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-B	37°C por 30'
10	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-E	37°C por 30'
11	1.2 ml tripsinizado	0.3 ml anti-F	37°C por 30'

* SNC: suero normal de conejo.

b.—Inocule 2 ratones por vía intraperitoneal con cada muestra a probar. Puede utilizar una inyectadora de 1 ml para inocular 2 ratones.

c.—Observe los ratones al menos por 4 días. Las muertes por botulismo ocurren entre las 6 y 24 horas después de la inoculación; sin embargo ocasionalmente pueden observarse muertes tardías. Los signos del botulismo en el ratón a menudo aparecen dentro de las 4 horas después de la inoculación e incluyen: piel erizada, respiración laboriosa y debilidad de los miembros⁽¹⁶⁾.

d.—Si la toxina botulínica está presente en los alimentos, o en su cultivo en suficiente cantidad para ser reveladas bajo las condiciones de prueba, el ratón que reciba la muestra no tratada debe morir y el que haya sido inoculado con el material calentado debe sobrevivir. Como la toxina debe ser neutralizada por la antitoxina específica el tipo responsable será revelado por el tipo de antitoxina mezclado con la muestra. Si el ratón no está protegido por las antitoxinas usadas, la toxina puede ser del tipo C-D o una potente antitoxina de los tipos probados. Para descartar los tipos C y D, repita la prueba utilizando extracto no tripsinizado y las antitoxinas adecuadas, al mismo tiempo que controles calentados y no calentados. Para probar una antitoxina potente, el extracto debe ser diluido en el diluyente especial de gelatina y repetida la prueba de neutralización. Si se trabaja con muestras provenientes de animales, los tipos C y D de antitoxina deben ser incluidos en la prueba de neutralización de rutina.

e.—Reconstituya la antitoxina diagnóstica de *C. botulinum* como lo recomienda el fabricante. Las instrucciones para reconstruir las antitoxinas diagnósticas preparadas por el NCDC están impresas en las etiquetas de los respectivos frascos.

En las pruebas de neutralización descritas, la antitoxina es diluida de manera que 1 unidad internacional esté contenida en 0.1 ml; por consiguiente cada ratón recibirá una unidad internacional de antitoxina. Una unidad de antitoxina neutraliza 10.000 dosis LD₅₀ por vía IP (intraperitoneal) en los casos de las toxinas de los tipos A, B, C, D y F ó 1.000 dosis ratón IP LD₅₀ en el tipo de toxina E.

E.—Tipaje de la toxina del *C. botulinum* en suero sanguíneo.

1.—Las muestras de sangre deben ser obtenidas tan pronto se conozca la iniciación de los síntomas y a intervalos durante el estado agudo y de convalecencia de la enfermedad. La cantidad de suero inyectado a los ratones no debe exceder de 1 0 ml, pues cantidades excesivas de suero humano pueden ocasionarle la muerte (15).

2.—La comprobación de la toxina y las pruebas de la neutralización son practicadas como se indica en el cuadro de la sección D con las siguientes excepciones:

a.—Se utiliza suero del paciente en lugar de extracto de alimento o cultivo líquido.

b.—Solamente los tubos 1, 3, 4, 5 y 6 son utilizados, puesto que el calentamiento coagularía el suero y la tripsinización no es necesaria para activar la toxina.

3.—Para ahorrar el suero del enfermo, es aconsejable algunas veces preparar mezclas polivalentes de antitoxinas y utilizar estas para pruebas de selección preliminar, antes de emplear las antitoxinas específicas.

**EXAMEN DE ALIMENTOS Y DE HECES PARA LA INVESTIGACION
DE *C. perfringens***

A.—Para demostrar que el *C. perfringens* es el agente causal en un brote de intoxicación alimentaria, tanto los alimentos sospechosos como las heces de los enfermos deben ser examinados cuando sea posible. La determinación cuantitativa del número de colonias del *C. perfringens* debe ser hecha en la muestra de alimento (18). Al menos 3 colonias de *C. perfringens* aisladas de los alimentos y 3 colonias aisladas de las heces por cada paciente, deben ser examinadas serológicamente para establecer el serotipo causante. En los grandes brotes, deben hacerse aislamiento de cada uno de los alimentos incriminados cuando esto es factible y 3 o más aislamientos de cada uno de diez pacientes diferentes.

B.—Numeración de *C. perfringens* en muestra de alimentos.

1.—Pese 50 gramos de alimento en un mortero. Prepare una dilución inicial al 1/10 del alimento, triture y diluya la muestra en 450 ml de agua tamponada en la forma siguiente:*

a.—Añada 1-2 gramos de arena estéril al contenido del mortero.

b.—Agregue una porción (15-20 ml) de la dilución de agua tamponada y triture en el mortero hasta obtener una suspensión homogénea.

c.—Transfiera la muestra triturada a un frasco de boca ancha utilizando la solución tamponada remanente para lavar cualquier alimento adherido al mortero y viértalo en el frasco bocón.

d.—Mezcle el contenido del frasco invirtiéndolo 50 veces.

e.—Prepare un frote de la suspensión del alimento para la coloración del Gram.

2.—Prepare diluciones 10 veces mayores (10^{-2} a 10^{-9}) por traspaso seriado de 1 ml de la muestra diluida a 9 ml de la solución tamponada.

3.—Siembre por duplicado placas de sulfito-polimixina-sulfadiazina agar (SPS) (18) las diluciones 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , en la forma siguiente:

a.—mida con una pipeta 1 ml de la dilución, previamente bien mezclada y viértala en una caja de Petri.

* La muestra de alimentos también puede ser homogenizada y diluida en 450 ml de solución tamponada utilizando una mezcladora eléctrica a baja velocidad (8.000 RPM) por 2 minutos

- b.—Añada 15 ml del medio fundido, mezcle bien y deje solidificar el agar.
- c.—Cuando el agar se solidifique recúbralo con una capa adicional de 4-5 mm de SPS agar.
- 4.—Incube las placas por 24 horas en jarra anaeróbica a 35-37° C.
- 5.—Después de 24 horas de incubación, abra la jarra anaeróbica y cuente las colonias negras en todas las placas que tengan entre 30 y 300 colonias negras. Utilice para su numeración el contador de colonias (Quebec) colocando un pedazo de papel (tisú) sobre la placa de vidrio del contador de manera de facilitar su numeración.
- 6.—Confirmación del *C. perfringens*.
- a.—Trasplante al menos 10 colonias negras representativas de cada cultivo a tubos de caldo carne dextrosa (o thioglicolato).
- b.—Incube el medio caldo carne dextrosa por 4 horas a 46° C ó una noche a 35-37° C.
- (1) Haga coloraciones de Gram de cada tubo de caldo carne dextrosa, para buscar bacilos Gram positivos con extremos romos y ausencia de esporas (generalmente).
- (2) Haga preparaciones en fresco para investigar movilidad.
- (3) Trasplante de cada tubo de caldo carne 2 tubos de indol-nitrito y un tubo de medio para movilidad. Incube a 35-37° C.
- c.—Lea la movilidad a las 24 y 48 horas. Después de 48 horas de incubación, investigue indol y la reducción de los nitratos a nitritos.
- Nota: Cantidades representativas del medio indol-nitrito pueden ser probadas a las 18-24 horas y solamente los tubos negativos deben ser reincubados.
- El *Clostridium perfringens* es inmóvil, raras veces produce esporas demostrables en caldo carne o thioglicolato. Reduce los nitratos a nitritos y es indol negativo.
- 7.—Calcule el número de *Clostridium perfringens* viables por gramo de muestras de Alimentos. Promedio total de la numeración en las placas X Relación *C. perfringens* a colonias negras X dilución = Contaje total por gramo de alimentos.
- Nota: Si el contaje total de las placas con 30-300 colonias negras es obtenida en dos diluciones, calcule el número total por cada dilución y promedie.
- 8.—Conserve al menos tres colonias diferentes de los *C. perfringens* aislados en medio de caldo carne para ser utilizados en el tipaje serológico.

C.—Aislamiento del *C. perfringens* de las heces.

- 1.—Inocule dos tubos de 25 ml. de caldo thioglicolato con aproximadamente 1 gramo de heces ó 5 ml de suspensión fecal.
 - a.—Caliente un tubo en agua a 80° C. por 15 minutos y luego enfrielo en agua corriente.
 - b.—Incube ambos tubos por cuatro horas a 46° C ó 18-24 a 35-37° C.
- 2.—Después de la incubación siembre de cada tubo de caldo thioglicolato placas de agar sangre y amarillo de huevo agar. Tome para la siembra con una pipeta capilar del fondo del tubo. Coloque una gota en cada placa y siembre en estrias por agotamiento para obtener colonias aisladas. Incube las placas por 24 horas en jarra anaerobica a 35-37°C.
- 3.—Retire de la estufa la jarra que contiene las placas. Deje la jarra a temperatura ambiente 2 horas (o en la refrigeradora a 4° C por 30 minutos) para obtener el desarrollo completo de la acción hemolítica.
- 4.—Destape la jarra anaerobica y tome al menos una colonia de cada tipo similar a *C. perfringens* y transfírela a tubos de medio caldo carne dextrosa (o thioglicolato) recientemente calentados y después enfriados. Incube los tubos por 4 horas a 46° C. o una noche a 35-37° C.
- 5.—Confirme los *C. perfringens* aislados morfológica y bioquímicamente como se señala en el punto B-6.
- 6.—Para tipaje serológico conserve como mínimo tres aislamientos diferentes de *C. perfringens* por cada muestra de heces examinada.

D.—Identificación serologica de *C. perfringens*.

- 1.—Con una pipeta capilar inocule en el fondo de un tubo con medio para antígeno de *C. perfringens* 0.5 ml de un cultivo de 18-24 horas en caldo carne dextrosa. Evite la introducción de partículas de carne. Inocule el medio-antígeno por 18 horas a 35-37°C.
- 2.—Después de 18 horas de incubación examine los cultivos en medio-antígeno.
 - a.—Prepare una extensión y tñiala por Gram. Compruebe la pureza del cultivo.
 - b.—Centrifugue el cultivo en tubos de centrífuga plásticos por 10 minutos a 10.000 RPM y descarte el líquido sobrenadante.
 - c.—Agregue solución salina al 0.85% formolada al 0.5% (0.5 a 1.0 ml) al sedimento para preparar una solución suficientemente turbia para aglutinación en lámina.

Nota: Puede ser necesario filtrar el antígeno al través de un

algodón no absorbente enrollado en la punta de una pipeta capilar, de manera de obtener una suspensión homogénea.

3.—Aglutinación en lámina.

a.—Con un lápiz graso marque la lámina en 5 ó 6 partes iguales.

b.—Coloque en cada una de las áreas marcadas, hacia el borde distante al operador una gota de los antisueros de *C. perfringens* (tipos 1-13 de Hobbs). (19). Incluya en la serie una gota de suero normal de conejo como control.

c.—Coloque una gota del antígeno a probar cerca del borde próximo al operador de cada área respectiva y mezcle antisuero y antígeno por movimientos de inclinación de la lámina.

d.—Anote cualquiera reacción que ocurra dentro de los 30 segundos siguientes así:

Negativo:	Sin aglutinación
1+ :	25 % de aglutinación
2+ :	50 % de aglutinación
3+ :	75 % de aglutinación
4+ :	100 % de aglutinación

El Laboratorio de Anaerobios del NCDC actualmente posee 74 antisueros específicos para *C. perfringens*; además de los 13 serotipos de Hobbs empleados de rutina en las investigaciones de *C. perfringens* en brotes de intoxicaciones alimentarias. Solamente los antisueros preparados con las cepas de Hobbs pueden ser obtenidos actualmente en el comercio.

X

CONSERVACION Y ENVIO DE LOS CULTIVOS DE ANAEROBIOS

Los anaerobios no esporulados son mantenidos en el NCDC congelando rápidamente a -70°C . la suspensión en sangre del crecimiento obtenido en tubos inclinados de agar sangre infusión y el almacenamiento inmediato de la referida suspensión a -42°C . Las especies de clostridios son cultivadas en medio de mantenimiento cerebro y los cultivos guardados a -20°C — 42°C . La liofilización de las bacterias anaerobias es también un procedimiento satisfactorio de conservación.

A.—Almacenamiento de los anaerobios no esporulados.

1.—Transfiera cultivos en crecimiento activo en caldo carne ó thio-glicolato a tubos inclinados de agar sangre e incube estos tubos a $35-37^{\circ}\text{C}$ en una jarra anaerobica por 48 horas o hasta que haya crecimiento confluyente.

- 2.—Con una pipeta capilar añada aproximadamente 0.35 ml. de sangre desfibrinada de conejo a cada tubo, suspenda el crecimiento en la sangre y transfiera la suspensión a un tubo de vidrio estéril de 6 x 50 mm Pyrex con tapa de algodón (Corning N° 9820 es satisfactorio). Corte el exceso de algodón y flamee el extremo del tubo.
- 3.—Enfríe rápidamente la suspensión sumergiendo el tubo que la contiene en una mezcla de alcohol al 95% y hielo seco. Luego de congelada almacenese en un congelador adecuado a — 42°C.
- 4.—Para recultivar los organismos congelados, tómesese el tubo a nivel del menisco de la sangre y rótese suavemente hasta que una pequeña porción se descongele. Aspire la porción descongelada con una pipeta capilar e inocule un medio recientemente calentado y enfriado de caldo carne dextrosa o thioglicolato. Repóngalo **inmediatamente** en el congelador para futura utilización. Incube el medio de aislamiento recién sembrado en jarra anaeróbica.

B.—Almacenamiento de anaerobios esporulados.

- 1.—Con pipetas capilares, transfiera cultivos de crecimiento activo en caldo carne dextrosa a medios de conservación de cerebro e incúbelos a 35-37°C.
- 2.—Diariamente haga exámenes por coloración de Gram para comprobación de la formación de esporas. Los cultivos son guardados en el congelador a -20° C. ó a -42° C tan pronto se desarrollen las esporas o después de cinco días de incubación si no se las observa.
- 3.—Para recultivar los organismos congelados descongele el medio de conservación, transfiera unas pocas gotas al fondo de un tubo de caldo carne dextrosa recientemente calentado y enfriado. Incube este medio en jarra anaeróbica.

C.—Envío de los cultivos anaerobios.

Los cultivos anaerobios pueden ser enviados para su investigación a un Laboratorio de Referencia en tubos de medio líquido o semi sólidos.

Las placas o medios inclinados no son satisfactorios.

Los cultivos deben ser purificados antes de su envío.

La mejor forma de enviar los cultivos es utilizando un medio libre de carbohidratos que contengan 0,3 a 1% de agar tal como el medio de movilidad. El medio debe haber sido recientemente preparado, reparado en tubos tapa rosca, en forma tal de obtener una columna de 5 a 7.5 cm. de altura (2 a 3"). También puede usarse medios de caldo carne simple si se trata de cultivos de clostridios y caldo thioglicolato si se trata de bacterias no esporuladas. Antes de su envío, cultivos en crecimiento activo en medios semisólidos o líquidos en tubos con tapa de rosca, serán recubiertos en una altura de $\frac{3}{4}$ a 1 pulgada (2 a 2.5 cm.) con parafina fundida o agar al 5%. Las tapas deben ser apretadas y selladas con cinta adhesiva a prueba de agua.

XI

MEDIOS PARA EL AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE BACTERIAS ANAEROBICAS

El método de preparación de los medios de cultivo es uno de los factores más importantes en el cultivo de los organismos anaerobicos exigentes. Las precauciones siguientes deben ser rigurosamente observadas:

- 1.—Evite el calentamiento excesivo. Los **medios de cultivo** no deben ser esterilizados en el autoclave por más de 15 minutos.
- 2.—Prepare los medios de cultivo a partir de frascos de medios deshidratados recientemente abiertos.
- 3.—Almacene los medios de cultivo en tubos tapa de rosca, en la oscuridad y a temperatura ambiente. Los tubos para reacciones bioquímicas con tapones de algodón deben ser guardados en la refrigeradora para evitar su evaporación.
- 4.—Los medios que contengan sustancias reductoras deben ser descartados después de 14 días de almacenamiento.

MEDIOS PARA UTILIZAR EN PLACAS

1.—Agar sangre

a.—Base.

- (1) Añada 0.5 gramos de extracto de levadura a 100 ml de agar base (infusión corazón, tripticasa soya agar, base para agar sangre, etc.)
- (2) Ajuste el (pH) a 7.3 a 7.5
- (3) Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.
- (4) Enfríe a 48° C.

b.—Añada 1 ml de solución estéril de vitamina K-hemina por cada 100 ml de medio (vea página 155).

c.—Agregue 5.0 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero por cada 100 ml de medio. Mezcle bien y vierta en placas.

2.—Amarillo de huevo agar (EYA) medio de Mc Clung y Toabe modificado. (3).

a.—Base.

(1) Tripticasa (BBL)	20 gm
Na ₂ PHO ₄	2.5 gm
NaCl	1.0 gm
MgSO ₄ Solución al 5%	0.1 ml
Glucosa	1.0 gm
Agar	12.5 gm
Agua destilada	500 ml

- (2) Ajuste el pH a 7.3 — 7.4.
- (3) Esterilice en autoclave a 121° C. por 15 minutos.
- (4) Enfrie a 60° C.

b.—Añada una yema de huevo, mezcle, y vierta en placas.

Las cáscaras de los huevos son decontaminadas previamente a la apertura y separación de la yema sumergiéndolos previamente en un beaker con alcohol a 95% por 1 hora.

3.—Fenil etil alcohol agar sangre (1)

Agregue 5 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero a 100 ml de agar base fenil etil alcohol, la cual ha sido esterilizada en autoclave y enfriada a 48° C. en baño de agua.

Mezcle y vierta en placas.

4.—Agar sangre con paronomicina-vancomicina-menadiona (2)

a.—Prepare la base para agar sangre como se describió en 1.a.

b.—Después de esterilizar el medio en autoclave y enfriarlo a la temperatura adecuada, por cada 100 ml de base, añada asepticamente lo siguiente:

- (1) 1 ml de la solución de vitamina K-hemina (vea página 155).
- (2) 10 mg de paronomicina (Parke Davis & Co.)
- (3) 0.75 mg de vancomicina (Eli Lilly & Co.)
- (4) 5 ml de sangre desfibrinada estéril de conejo o carnero.

c.—Mezcle y vierta en placas.

Nota: Ambos antibióticos: Kanamicina (Laboratorios Bristol) y Neomicina (Eli Lilly & Co.) en concentración final de 100 mcg/ml pueden sustituir a la paronomicina.

MEDIOS DIFERENCIALES

1.—Thioglicolato:

Utilice cantidades de 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tapa de rosca

2.—Medio base para la fermentación (M. B. F.):

Se usa caldo thioglicolato sin glucosa e indicador. Por cada 1.000 ml. de medio, agregar:

Extracto de levadura	2 gm.
Azul de Bromotímol en solución acuosa al 1%	1 ml.

Reparta en cantidad de 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tubos de fermentación incluidos.

3.—Glucosa:

Añada 6 gramos de glucosa a 1.000 ml de M.B.F. antes de repartir y esterilizar. Utilice 8.5 ml. en tubos de 15 x 125 mm. con tubos de fermentación incluidos.

4, 5, 6, 7, 9 y 11; 12.

Manitol, lactosa, sacarosa, maltosa, glicerol, xilosa, arabinosa;

A 8 ml. de M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente ⁽²⁾

0 5 ml. de solución al 10% del sustrato esterilizado por filtración en filtro Seitz.

8.—Salicina:

A 8 ml. del M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente

1 ml. de salicina al 5% esterilizada por filtración en filtro Seitz;

10.—Almidón:

A 8 ml. del M. B. F. esterilizado en autoclave

agregue asépticamente

1 ml. de la solución al 2% de almidón soluble esterilizada por filtración en filtro Seitz.

13.—Indol-Nitrito (BBL)

Reparta 8.0 ml en tubos de 15 x 125 mm.

14.—Indol Nitrito (BBL): Reparta 8 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

15.—Medio Caldo Carne

Carne picada (libre de grasa)	500 gm.
Agua destilada	1000 ml.
1 N NaOH	25 ml.

Utilice carne magra de res o de caballo. Elimine la grasa y el tejido conectivo antes de molerla. Mezcle la carne con agua y la solución de NaHO y calientela hasta la ebullición moviendo la suspensión. Enfríe en la refrigeradora por una noche y quite la nata de grasa remanente. Filtre la mezcla a través de 2 capas de gaza y extienda las partículas de carne para secarlas parcialmente.

Añada suficiente agua para restaurar el volumen original de 1000 ml. agreguele:

Tripticasa o peptona	30 gm.
Extracto de levadura	5 gm.
Fosfato de Potasio	5 gm.

Ajustese el pH a 7.8 con 1 N. NaOH.

Con un cucharón pequeño reparta las partículas de carne en tubos tapa de rosca de 15 x 125 mm. y añada el filtrado enriquecido. Utilice aproximadamente 1 parte de partículas de carne por 3 a 4 partes de líquido (v/v) por tubo. Añada algunas limaduras de hierro a cada tubo los cuales deben estar llenos hasta la mitad (8 ml. de líquido) Esterilice a 121° C. por 15 minutos.

16.—**Caldo carne Glucosa:** Agregue 3 gm. de glucosa por litro de filtrado de caldo carne picada antes de repartirlo.

Caldo carne dextrosa-almidón: Añada 2 gm. de almidón soluble por cada 1000 ml. de filtrado de carne-picada-glucosa antes de repartirla.

Caldo carne almidón: Agregue 2 gm. almidón soluble por cada 1.000 ml. de filtrado de caldo carne antes de repartirlo.

17.—**Leche-hierro:** Coloque unas cuantas limaduras de hierro en el fondo de un tubo de 15 x 125 mm. añada 8 ml. de leche **completa no homogenizada** a cada tubo. Esterilice en autoclave a 121° por 15 minutos.

18.—**Suero de Loeffler:** Rehidrate suero sanguíneo según Loeffler (Difco) según las instrucciones del fabricante. Reparta 8 ml. en tubos tapa de rosca de 15 x 125 mm. Esterilice como lo indique el fabricante.

19.—**Medio para la producción de H₂S:**

Tripticasa (BBL)	1.00 gm.
Extracto de levadura	0.50 gm.
Agar	0.20 gm.
Acetato de plomo	0.02 gm.
Glucosa	0.50 gm.
H ₂ O destilada	1000.00 ml.

Ajuste el pH a 7.2-7.3. Reparta 8 ml. en cada tubo de rosca de 15 x 125 mm. Esterilice a 121° por 15 minutos.

20.—**Thiogel (BBL):** Reparta 9 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

21.—**Urea:** Añada suficiente agua destilada a 31 gm. de caldo urea (Difco) para hacer un total de 100 ml. Filtre al través de filtro Seitz. Agregue 1 ml. por cada 8 ml. de base de fermentación esterilizada en autoclave. (2).

12.—**Medio de Movilidad**

Medio movilidad (Difco)	16 gm.
Caldo nutritivo	4 gm.
Na Cl	1 gm.
Agua destilada	1000 ml.

Reparta 8 ml. por tubo de 15 x 125 mm. Esterilice en autoclave a 121° por 15 minutos.

23.—Triple azúcar-hierro-agar en tubos en bisel. (Difco).

24.—Tubos de esculina en bisel

Esculina	1.0	gm.
Citrato de hierro	0.5	gm.
Infusión corazón agar	40.0	gm.
Agua destilada	1000.0	ml.

Ajuste el pH a 7.0 Reparta 5 ml. en tubos de 15 x 125 mm.

Esterilice en autoclave a 121°C. por 15 minutos, enfrielos de manera que formen bisel.

25.—Infusión agar en bisel: Utilice corazón infusión agar (Difco) tripticasa (BBL) más 1.5% de agar, etc. Reparta en tubos de 15 x 125 mm. Esterilice en autoclave y deje enfriarlos de manera que formen bisel.

26.—Agar-infusión-dextrosa en bisel: Añada 1 gm. de dextrosa a 100 ml. de agar infusión, Esterilice en autoclave y deje enfriar en posición inclinada.

27.—Medio para formación de antígenos del *Cl. perfringens*:²⁰

Caldo nutritivo	1.6	gm.
Glucosa	0.2	gm.
Solución al 10% de Cisteína HCL	0.5	ml.
Solución tampón de fosfato*	2.4	ml.
Agua destilada	100.0	ml.

Ajuste el pH a 7.4. Reparta en cantidades de 5 ml. en tubos de 13 x 100 mm. tapa de rosca. Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.

*Solución tampón de fosfato: Disuelva 14 gramos de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ y 1 gm. de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 60 ml. de agua destilada.

MEDIOS DE CONSERVACION

1.—Medio de conservación con cerebro:

Añada una pequeña cantidad de agua al cerebro de carnero o bovino y licúelo en una licuadora mecánica.

Prepare una solución de peptona, utilizando 20 gm. de peptona en 100 ml. de agua destilada. Ajuste el pH a 7.2-7.4. Vierta en tubos tapa rosca de 13 x 100 mm. utilizando 1 parte de cerebro más 2 partes de agua peptonada. Los tubos deben llenarse hasta la mitad. Esterilice en autoclave a 121°C. por 15 minutos.

2.—Medio de Gibbons y MacDonald (modificado)²¹.

a: Base.

(1) Triptícasea (BBL)	15.0	gm.
Extracto de levadura	3.0	gm.
Glucosa	5.0	gm.
NaCl	5.0	gm.
K ₂ HPO ₄	2.5	gm.
Thioglicolato de sodio.	0.5	gm.
Hemina (cristalina)	5.0	miligramos
Agar	15.0	gm.
Agua destilada	100.0	ml.

(2) Ajuste el pH a 7.6.

(3) Esterilice en autoclave a 121° C por 15 minutos.

(4) Añada 10 ml. de solución estéril al 10% de NaHCO₃ (esterilizado por filtración).

(5) Agregue 0.1 ml de la solución madre de menadiona (pág. 155).

b.—Vierta asepticamente 11 ml. en cada tubo de 16 x 150 mm. con tapa de rosca, déjelos que coagulen en forma tal que formen un taco largo (aproximadamente 6.5 cm.) y un bisel corto.

3.—Medio de Mantenimiento para Actinomyces: (22) Actinomyces broth BBL).

a.—Parte I:

(1) Solución salina	250.0	ml.
KH ₂ PO ₄	60.00	gm.
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.00	gm.
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.80	gm.
CaCl ₂	0.08	gm.

Disuelva en un litro de agua destilada.

(2) Casitona (U.S.P.), Digestión pancreática 4.0 gm.

(3) Cisteína HCL 1.0 gm.

(4) Extracto de levaduras 2.0 gm.

(5) Caldo infusión cerebro-corazón (Difco) 25.0 gm.

Ajuste el pH del medio a pH 6.5 con KOH al 20% y diluya hasta 500 ml. Esterilizar por filtración.

b.—Parte II:

Agua destilada	500.0	ml.
Glucosa	5.0	gm.
Agar	7.0	gm.
Almidón purificado de papas Baker	10.0	gm.
Acido oleico	1000.0	ml.

100 mgm/100 ml. de agua destilada y neutralizada a pH 7.0 con N NaOH

Prepare el medio vertiendo el almidón en 50 ml. de agua fría, luego mézclelos a 450 ml. de agua hirviendo y agréguele los componentes restantes.

Esterilice en autoclave la Parte II y mezcle con la Parte I mientras esté todavía caliente, luego complete hasta 1 litro.

Reparta en tubos estériles y sellelos con la mezcla pirogalol-carbonato de sodio.

Pirogalol-100 gramos/150 ml. de agua destilada

Carbonato de sodio sol. al 10%

Introduzca el tapón de algodón, cubra con un pedazo de algodón absorbente, añada 5 gotas de cada una de las soluciones arriba mencionadas y tape con un tapón de goma.

XII

REACTIVOS

Azul de Bromotimol al 1% :

Disuelva 1 gm. de azul de bromotimol en 20 ml. de hidróxido de sodio 0.1 N. Añada 80 ml. de agua destilada.

Agua tamponada:

1.—Solución buffer madre:

KH_2PO_4	32 gm.
Agua destilada	500 ml.

Ajuste el pH a 7.2 (usualmente se requiere aproximadamente 175 ml. de hidróxido de sodio normal). Agregue agua destilada hasta completar 1 litro.

2.—Solución buffer de trabajo

Solución madre buffer de fosfato	1.25 ml.
Agua destilada	C.S.P. 1000 ml.

Reparta cantidades de 450 ml. en frascos de medicina de 32 Oz. o en cantidades de 9 ml. en tubos tapas de rosca de 16 x 150 mm.

Esterilice en autoclave a 121°C por 15 minutos.

Carbol fuscina al 1%:

Disuelva 1 gramo de fuscina básica en 10 ml. de alcohol a 95%. Agregue 5 ml. de fenol y 85 ml. de agua destilada. Diluya 1:2 con alcohol 95% antes de usarla.

Ehrlich (Reactivo para el Indol). (23).

Disuelva 4 gm. de para-dimetil-amino-benzaldehido en 380 ml. de alcohol etílico al 95% y añada 80 ml. de ácido clorhídrico concentrado.

Gelatina: (diluyente)

Gelatina	2 gm.
Na ₂ HPO ₄	4 gm.
H ₂ O destilada	1000 gm.

Ajuste el pH a 6.2 con HCL.

Reparta en frascos tapa rosca y esterilicelos en autoclave a 121° C. por 15 minutos.

Metileno Azul de (Indicador): (Smith, modificador) (24).

Na H CO ₃	40 gm.
Glucosa	100 gm.
Azul de metileno	Trazas

Nitratos, Solución A: (23).

Disuelva 5 gm. de ácido sulfanílico en 1000 ml. de 5 N ácido acético.

Nitratos, Solución B: (23).

Disuelva 5 gm. de dimetil-alfa-naftilamina en 1000 ml. de 5 N ácido acético.

Fenol, Rojo de: 1%

Disuelva 1 gm. de rojo de fenol en 30 ml. de 0.1 N. Na OH. Añada 70 ml. de agua destilada.

Tripsina, Solución al 1%

Disuelva 1 gm. de tripsina 1:250 (Difco) en 100 ml. de agua destilada.

Guárdela en la refrigeradora. Prepare soluciones frescas cada semana.

Vaspar:

Fundir conjuntamente partes iguales (peso/peso) de vaselina y parafina. Mezcle, vierta la mezcla en frascos de Erlenmeyer tapa de rosca y esterilice en autoclave a 121° C por 30 minutos.

Vitamina K-hemina, Solución de:

1. Solución madre de hemina:

Disuelva 50 mgm. de hemina en 1 ml. de solución N de Na OH. Añada 100 ml. de agua destilada.

Esterilice en autoclave a 121° C. por 15 minutos.

2. Menadiona (Solución madre de) 100 mgm.

alcohol etílico 95% 20 ml. Esterilizar por filtración.

3. Solución de trabajo de Vitamina K-hemina:

Añada 1 ml. solución de estéril de menadiona a 100 ml. de solución estéril de hemina.

4. Para usarla añada 1 ml. de la solución vitamina K-hemina por cada 100 ml. de medio estéril o 0.08 ml. por cada tubo con 8 ml. de medio.

X I I I

PROCEDIMIENTOS DE COLORACION

L.—Coloración de Gram.

- 1.—Fije los frotos pasándolos sobre la llama de manera que reciban un calor suave.
- 2.—Cubra la lámina durante 1 minuto con una mezcla de partes iguales de solución cristal violeta según Hucker y solución bicarbonato de sodio al 1%. Lave brevemente con agua corriente (no más de 5 segundos).
- 3.—Cubre las láminas con solución de Ioduro de Gram por 1 minuto y lávela luego con agua corriente.
- 4.—Cubra las preparaciones con alcohol a 95% y bote rápidamente. Recubra las preparaciones con alcohol a 95% por 10 segundos y lave con agua corriente.
- 5.—Cubra las láminas con solución de safranina según Hucker por un minuto (1) y lave la preparación con agua corriente.

Coloración de esporas: (23).

A: Schaeffer-Fulton (1933), modificación al de Wirtz (1908).

Procedimiento de Coloración:

- 1.—Haga los frotos y fijelos por el calor.
- 2.—Cubra las preparaciones con solución acuosa de verde malaquita al 5% por 30-60 segundos.
- 3.—Caliente la lámina hasta emisión de vapores por 3 a 4 veces.
- 4.—Elimine el exceso de colorante con lavado en agua corriente.
- 5.—Tiña 30 segundos con solución acuosa de safranina O al 0.5%
- 6.—Lave el frote con agua corriente.
- 7.—Seque. Examine.

Resultado: Esporas: Verde

Restos de las células: Rojos.

Nota: A veces se experimenta algunos inconvenientes debido al desvanecimiento de la coloración verde después de algunos días. Aparente-

mente esto es debido a una reacción alcalina y puede ser evitada por una limpieza previa de las láminas con una solución ácida antes de hacer las preparaciones. (La alcalinidad de las láminas portaobjetos puede ser debido a una capa invisible de jabón o sustancias detergentes).

B.—Método en "frio" de Bartholomew y Mittmer.

Tiempos de la Coloración

- 1.—Fije por el calor los frotos secados al aire, pasándolos 20 veces por la llama.
- 2.—Taña por 10 minutos con solución acuosa saturada de verde malaquita aproximadamente 7.6% sin calentar.
- 3.—Lave en agua de chorro por 10 segundos.
- 4.—Coloree por 15 segundos con solución acuosa de safranina al 0.25%.
- 5.—Lave en agua corriente y seque con papel secante.

Resultado: Esporas: Verde Resto de las células: Rojo.

X I V

MÉTODOS PARA OBTENER ANAEROBIOSIS UTILIZACIÓN DE LAS JARRAS PARA CULTIVOS ANAEROBICOS

Las jarras para cultivos anaerobicos aunque de aspectos diferentes tienen funciones similares. El material por incubar se coloca en la jarra y se establece un sello a prueba de aire entre el cuerpo de la jarra y su tapa. El aire es parcialmente extraído y reemplazado por una mezcla gaseosa libre de oxígeno. El oxígeno residual es reducido por el hidrógeno de la mezcla gaseosa reemplazante. El catalizador de paladio ubicado en la tapa de la jarra acelera el proceso de reducción del oxígeno.

La jarra anaeróbica de Brewer y de Torbal difieren algo en el método de sellado y en el catalizador utilizado. Para realizar un sello a prueba de aire en la jarra de Torbal se utiliza un anillo de goma (O-Ring) entre el fondo de la jarra y su tapa. En la jarra de Brewer, se utiliza plasticina en el sellado a prueba de aire y el catalizador es colocado encima de una pantalla metálica en la tapa de la jarra y es calentado por corriente eléctrica. Un catalizador que no necesita ser calentado, pues actúa a temperatura ambiente, es utilizado en la jarra de Torbal y en el (O-Ring seal) Gaspak.

El azul de metileno es utilizado para indicar que las condiciones anaerobicas han sido logradas. En presencia de oxígeno el azul de metileno es azul, en su ausencia es incoloro. Si se utilizan temperaturas inferiores a 35° C. reduzca la solución indicadora previamente a su introducción en la jarra colocándola en agua hirviendo durante algún tiempo.

La mezcla de gases contiene 10% de hidrógeno, 10% de bióxido de carbono y 80% de nitrógeno (Matheson Co., East Rutherford, N. J.). Una

bombona llena de gas tiene una presión de 1.500 libras (aproximadamente). Estas bombonas de gas deben ser fijadas con seguridad a un pilar o a la pared por medio de un soporte adecuado.

Para facilitar la operación, la fuente de vacío, bombona, manómetro y jarra anaeróbica, son conectadas con conexiones en T y tubos de goma como se ilustra en la figura N° 2.

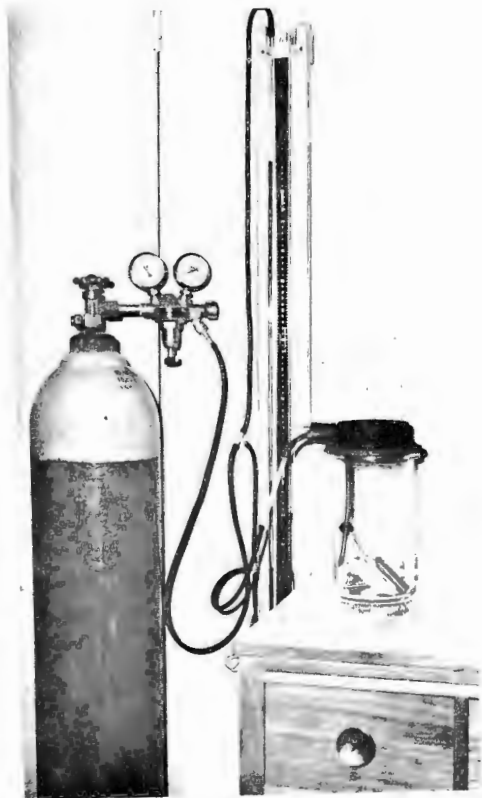
Todas estas conexiones deben ser realizadas a prueba de escapes con grasa de vacío.

Si no se tiene a mano un manómetro, se puede incorporar un balón al sistema para revelar que las presiones estén niveladas.

El burbujeo del líquido del indicador puede ser utilizado como guía de un adecuado vacío.

USO DE LA JARRA DE BREWER

- 1.—Coloque el material a incubar en el interior de la jarra.
- 2.—En un tubo de 15 x 125 mm., coloque la mezcla de azul de metileno-Na H CO₃-glucosa en cantidad que alcance una altura de aproximadamente 1.3 cm. (0.5 pulgadas). Agregue agua hasta la mitad y mezcle. Coloque el tubo en la jarra.
- 3.—Prepare un cordón de plasticina de diámetro uniforme y colóquelo encima del borde de la jarra y una los extremos cuidadosamente haciéndoles presión.
- 4.—Coloque la tapa de la jarra sobre el cordón de plasticina y presione hacia abajo.
- 5.—Conecte el terminal de la tapa de la jarra al sistema vacío-manómetro en la forma indicada en la figura N° 2.
- 6.—Haga el vacío equivalente a 30 cm. de mercurio. Coloque una pinza de Kocher o similar en el tubo que comunica con la fuente de vacío y cierre el vacío.
- 7.—Lentamente llene la jarra con el gas de reemplazo.
- 8.—Quite la pinza del tubo que comunica con la fuente de vacío.
- 9.—Repita las operaciones 6, 7 y 8.
- 10.—Repita las operaciones 6 y 7.
- 11.—Fije la pinza y aprieta en la salida de la tapa de la jarra.
- 12.—Desconecte la jarra del sistema vacío-gas-manómetro.
- 13.—Quite la pinza a la fuente de vacío.
- 14.—Conecte la tapa al terminal eléctrico y calientela por 10 minutos.
- 15.—Desconéctela de la corriente y coloque la jarra en la estufa.



Sistema de Vacío y reemplazo gaseoso

A la izquierda: Bombona con mezcla gaseosa compuesta de 10% de Hidrógeno, 10% de CO_2 y 80% de Nitrógeno. Aparecen los manómetros indicadores de presión y medidor de salida de gases.

En el centro manómetro para indicar el vacío en la jarra. El nivel de mercurio en la gráfica indica 30 cms. de presión negativa.

A la derecha, jarra de Brewer.

USO DE GASPAC EN LA JARRA DE BREWER

- 1.—Apague todas las llamas antes de trabajar con la jarra. Conecte el balón que acompaña al equipo de Gas-pack al extremo de salida de la tapa de la jarra de Brewer.
- 2.—Conecte la tapa a la corriente y caliente el catalizador por 10 minutos antes de colocar la tapa a la jarra.
- 3.—Coloque el material a incubar dentro de la jarra.
- 4.—Coloque el tubo indicador de azul de metileno en la jarra.
- 5.—Aplique una delgada capa de mezcla selladora (Fisher Cello Seal 14-636 puede ser utilizada) a la boca de la jarra y a la tapa de la jarra de Brewer.
- 6.—Corte una esquina del paquete de Gas-pack y coloque el paquete verticalmente en la jarra.
- 7.—Con una pipeta, vierta dentro del Gas-pack por la esquina cortada 10 ml. de agua destilada o de chorro y presione la tapa de Brewer sobre la boca.
- 8.—Deje que la reacción se produzca por 35 minutos.
- 9.—Cierre con una pinza el tubo de salida de la tapa; desconecte la electricidad y el balón de la tapa. Coloque la jarra en la estufa.

El procedimiento con la nueva jarra anaeróbica Gas-pack⁽²⁵⁾ es esencialmente el mismo, sin embargo, la jarra se suministra con un catalizador que actúa a la temperatura ambiente, en una jarra que se sella con un anillo especial de goma (O-Ring-Seal), no tiene conexiones eléctricas y tampoco salida para escape de la presión. Se añaden 10 ml. de agua al paquete de Gas-pack, la tapa es fijada con la abrazadera **atornillada solamente a mano** y luego colóquela en la estufa. La abrazadera está manufacturada de manera de dejar escapar cualquier exceso de presión.

X V

REFERENCIAS CITADAS

- 1.—Dowell, V. R. Jr. Hill, E. O. and W. A. Altemeier, 1964. Use of phenethyl alcohol in media for insolation of anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 88:1811-1813.
- 2.—Finogold, S. M. Miller, A. B. and D. J. Posnick. 1965. Further studies on selective media for Bacteroides and other anaerobes. *Ernährungsforschung* 10:517-528.
- 3.—McClung, L. S. And R. Toabe, 1947. The egg yolk plate reaction for the presumptive diagnosis of *Clostridium sporogenes* and certain species of the gangrene and botulinum groups. *J. Bacteriol.* 53:139-147.
- 4.—Smith, L. DS. 1955. Introduction to the pathogenic anaerobes. U. Chicago Press, (Out of print).

- 5.—Smith, L. D.S. and L. V. Holdeman, 1966 (to be published). Pathogenic anaerobes. Charles C. Thomas, Springfield, III.
- 6.—Lewis, K. H. and K. Casel, Jr. (ed.) 1964. Botulism. Proceeding of a symposium. Public Health Service Pub. 999-PP-1-Cincinnati.
- 7.—Sterne, M. and G. H. Warrack, 1964. The types of *Clostridium perfringens*, J. Path. Bacteriol, 88:279-283.
- 8.—Prevot, A. R. and V. Fredette, 1966. Manual for the Classification and Determination of the Anaerobic Bacteria. 1st. American ed. Lea and Febiger, Philadelphia.
- 9.—Eiken, M. 1958. Studies on an anaerobic, rod-shaped, gram-negative microorganism: *Bacteroides corrodens* n. sp. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 43:404-416.
- 10.—Pine, L. and Georg 1965. The classification and phylogenetic relationships of the Antinomycetales. Int. Bull. Bact. Nom. Tax. 15:143-163.
- 11.—Werner, H. 1966. The gram positive nonsporing anaerobic bacteria of the human intestine with particular reference to the *Corynebacteria* and *Bifidobacteria*. J. Appl. Bacteriol, 29:138-146.
- 12.—Beerens, H. M. Tahon-Castel, 1965. Infections humaines a bacteries anaerobies non toxigenes. Press Acad. Europ., Bruxelles.
- 13.—Moss, C. W. Dowell, V. R., Jr., Lewis, V. W. and M. A. Schekter, 1967. Cultural characteristics and fatty acid composition of *Corynebacterium acnes* J. Bacteriol, 94:1300-1305.
- 14.—Holdeman, L. V., Cato E. P. and W. E. C. Moore, 1967. Amended description of *Ramibacterium alactolyticum* Prevot and Taffanel with proposal of a neotype strain. Int. Bull. Bact. Nom. Tax. 17:323-341.
- 15.—Koenig, M. G., Spickard, A. Cardella, M. A. and D. E. Rogers, 1964. Clinical and laboratory observation of type E Botulism in man. Medicine 43:517-545.
- 16.—Duff, J. T. Wright, G. G. and A. Yarinsky, 1956. Activation of *Clostridium botulinum* type E toxin by trypsin. J. Bacteriol 72:455-460.
- 17.—Eklund M. W., Weiler, D. I. and F. T. Poysky. 1967. Outgrowth and toxin production of nonproteolytic type B *Clostridium botulinum* at 3.3 to 5.6-C. J. Bacteriol. 93:1461-1462
- 18.—Angelotti, R., Hall, H. E., Foter, M. J. and K. H. Lewis. 1962. Quantitation of *Clostridium perfringens* in food. Appl. Microbiol. 10:193-199.
- 19.—Hobbs, B. C. 1965. *Clostridium welchii* as a food poisoning organism J. Appl. Bacteriol. 28:74-82.
- 20.—Klotz, A. W. 1965. Application of FA techniques to detection of *Clostridium perfringens*. Public. Health Reports. 80:305-311.
- 21.—Gibbons, R. J. and J. B. MacDonald. 1960. Hemin and vitamin K compounds as required factors for cultivation of certain strains of *Bacteroides melaninogenicus*, J. Bacteriol 89:164-170.
- 22.—Georg, L. K., Robertad, G. W. and S. A. Brinkman, 1964. Identification of species of Actinomycetes. J. Bacteriol. 88:477-490.
- 23.—Society of American Bacteriologists. 1957. Manual of Microbiological Methods. McGraw-Hill.
- 24.—Bailey, W. R. and E. G. Scott. 1962. Diagnostic microbiology. C. V. Mosby, Co., St. Louis.
- 25.—Brewer, J. H. and D. L. Allgeir, 1966. Safe self-contained carbon dioxide-hydrogen anaerobic system. Appl. Microbiol. 14:985-988.

XVI

B I B L I O G R A F I A

GENERAL

- Breed, R. S., Murray, E. G. D. and N. R. Smith, 1957, *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7th Ed. Williams & Wilkins, Co., Baltimore.
- Prevot, A. R. 1960. *Tecnicas pour le diagnostic des bacteries anaerobies*. Tourelle St. Mandé (Seine).
- Willis, A. T. 1964. *Anaerobic bacteriology in clinical medicine*, 2nd ed. Butterworth Co., London.

METODOS ANAEROBICOS

- Dowell, V. R., Jr., Hill, E. O. and W. A. Altemeler 1962. Methods for the isolation and identification of non-sporulating anaerobic bacteria from clinical specimens. *Bacteriol. Proc.* P. 90.
- Fredette, V. 1964. The role of the anaerobic bacteria with particular reference to the virulence of *Clostridium perfringens*. *Rev. Canad. Biol.* 23:85-93.
- Hall, I. C. 1929. A review of the development and application of physical and chemical principles in the cultivation of obligately anaerobic bacteria. *J. Bacteriol.* 17:25-301.
- Moore, W. E. C. 1966. *Tecnicas for routine culture of anaerobes Intern. J. Syst. Bacteriol.* 16:173-190.
- Holdeman, L. V. 1964. Isolation and identification of anaerobic bacteria from clinical material. *Public Health Lab.* 22:154-168.
- Hungate, R. E. 1950. The anaerobic mesophilic cellulolytic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 14:1-49. (See pp. 1-7.)
- Reed, G. B. and J. H. Orr, 1943. Cultivation of anaerobes and oxidation reduction potentials, *J. Bacteriol.* 45:309-320.

BOTULISMO

- Dolman, C. E. 1957. Recent observation on type E botulism. *Canad. J. Public Health*, 48:187-198.
- Dolman, C. E. and L. Murakami. 1961. *Clostridium botulinum* type F with recent observations on other types, *J. Infect. Dis.* 109:107-128.
- Poster, E. M. and H. Sugiyama, 1966. Latest developments in research on botulism, *J. Milk Food Technol* 29:342-347.
- Lamanna, C. 1959. The most poisonous poison. What do we know about the toxin of botulism? What are the problem to be solved? *Science* 130:763-772.
- Meyer, K. F. 1956. The status of botulism as a world health problem. *Bull. World Health Organ.* 15:281-298.
- Ward, B. Q., Carroll, B. J. Carret, E. S. and G. B. Reese, 1967. Survey of the U. S. Gulf Coast for the presence of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 15:623-636.

CLASIFICACION DE LOS CLOSTRIDIOS

- Batty, I and P. D. Walker, 1965. Colonial morphology and fluorescent labelled antibody staining in the identification of species of the genus *Clostridium* *J. Appl. Bacteriol.* 28:112-118.

Moore, W. E. C., Cato, E. P. and L. V. Holdeman, 1966. Fermentation patterns of some *Clostridium* species. Intern. J. Syst. Bacteriol. 16:383-415.

Oakley, C. L. 1963. Classification of the genus *Clostridium* World Symp. Diseases Caused By Anaerobes. Office Internat. Epizootics, Paris.

Oakley, C. L. and G. H. Warrack, 1953. Routine typing of *Clostridium welchii*. J. Hyg. 51:102-107.

Sanada, I. and S. Nishida, 1965. Isolation of *Clostridium tetani* from soil. J. Bacteriol. 89:626-629.

Smith, L. D.S. and E. King 1962. *Clostridium innocuum*, sp. n. A spore-forming anaerobe isolated from human infections. J. Bacteriol. 83:938.

Clostridium Perfringens e Intoxicaciones Alimentarias Ocasionadas por C. perfringens.

Altmeier, W. A. 1944. The rapid identification of the *Clostridium welchii* in accidental wounds. Surg. Gynecol. and Obstet. 78:1-4.

Brooks, M. E. Sterne, M. and G. H. Warrack, 1957. A reassessment of the criteria used for type differentiation of *Clostridium perfringens*. J. Pathol. and Bacteriol. 74:185-195.

Collee, J. G. Knowlden, J. A. and B. C. Hobbs. 1961. Studies on the growth, sporulation and carriage of *Clostridium welchii*, with special reference to food-poisoning strains, J. Appl. Bacteriol. 24:326-339.

Dack, G. M., Sugiyama, H., Owens, F. J. and J. B. Kirsner. 1954. Failure to produce illness in human volunteers fed *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*, J. Infect. Diseases 94:34-38.

Ellner, P. D. 1956. A medium promoting rapid quantitative sporulation in *Clostridium perfringens*, J. Bacteriol. 71:495-496.

Galton, M. M. and J. H. Steele, 1961. Laboratory and epidemiological aspects of foodborne diseases, J. Milk Food Technol. 29:104-114.

Gibbs, B. M. and B. Freame, 1965. Methods for the recovery of clostridia from foods, J. Appl. Bacteriol. 28:95-111.

Hall, H. E., and R. Angelotti. 1965. *Clostridium perfringens* in meat and meat products. Appl. Microbiol. 13:352-357.

Hall, H. E. Angelotti, R., Lewis, K. H., and M. J. Foter, 1963. Characteristics of *Clostridium perfringens* strains associated with food and foodborne disease. J. Bacteriol. 85:1094-1103.

Hall, H. E. and G. H. Hauser, 1966. The examination of feces from food handlers for *Salmonellae*, *Shigellae*, enteropathogenic *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 14:928-933.

Kemp, G. E., Procter, R. and A. S. Browne. 1962. Foodborne disease in California with special reference to *Clostridium perfringens (welchii)* Public Health Rept. 77:910-919.

Knox, R. and E. K. MacDonald. 1895. Outbreaks of food poisoning in certain Leicester Institutions, Medical Officer 69:21-22.

Lowbury, E. J. L. and H. A. Lilly, 1955. A selective plate medium for *C. welchii*. J. Pathol. Bacteriol. 70:105-108.

Marshall, R. S. Steenbergen, J. F. and L. S. McClung, 1965. Rapid technique for the enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microbiol. 13:559-563.

- McClung, L. S. 1945. Human food poisoning due to growth, of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chickens: Preliminary note. *J. Bacteriol.* 50:229-231.
- McNicol, M. and E. J. McKillop. 1958. Food poisoning caused by *Clostridium welchii* in cold chicken. *Lancet.* 1:787-789.
- Mossel, D. A. A., Koopman, M. J. and E. Jongerins. 1967. Enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *Appl. Microbiol.* 15:650-653.
- Mossel, D. A. A., De Bruin, A. S. Van Diepen. H. M. J., Vendrig, C. M. A., and G. Zoute-welle, 1956. The enumeration of anaerobic bacteria, and of *Clostridium* species in particular, in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 19:142-154.
- Mossel, D. A. A., 1959. Enumeration of sulfite-reducing *Clostridia* occurring in foods *J. Sci. Food Agr.* 19:662-669.
- Nygren, B. 1962 Phospholipase C-producing Bacteria and food poisoning. *Acta Path, Microbiol. Scand* 56: Suppl. 160.
- Southworth, J. M. L. and D. H. Strong, 1964. Comparison of media for the isolation of *Clostridium perfringens* from food, *J. Milk Food Technol* 27:205-209.
- Strong, D. H. Canada, J. C. and B. E. Griffiths. 1963. Incidence of *Clostridium perfringens* in american foods, *Appl. Microbiol.* 11:42-44.
- Wetzler, T. F. Marshall, J. D., Jr. and M. A. Cardella. 1956. Rapid isolation of *Clostridiums* by selective inhibition of aerobic flora. II, A. systematic method as applied to surveys of *Clostridium* in Korea, *Am. J. Clin. Pathol.* 26:345-351.
- Willis, A. T. 1957 A rapid method for the purification of some clostridia from mixtures with other organisms, especially the aerobic sporeformers. *J. Pathol. Bacteriol.* 74:113-117.
- Yamagishi, T., S. Ishida and S. Nishida 1964. Isolation of toxigenic strain of *Clostridium perfringens* from soil *J. Bacteriol.* 88:646-652.

ANTICUERPOS FLUORESCENTES

- Boothroyd, M. and D. L. Georgala. 1964 Immunofluorescent identification of *Clostridium botulinum*. *Nature* 202:515-516.
- McCain, C. S. 1967. Isolation and identification of *Clostridium hemolyticum* in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 28:878-880.
- Midura, T. F. Inouye, Y. and H. L. Bodily. 1967. Use of immunofluorescent to identify *Clostridium botulinum* types A, B, and E. and E. *Public Health Rept.* 82:275-279.
- Walker, P. D. and I. Batty. 1964. Fluorescent studies in the genus *Clostridium*, I. The loca-tion of antigens on the surface of *Clostridium sporogenes* during sporulation and germina-tion *J. Appl. Bacteriol.* 27:137-139.
- Walker, P. D. and I. Batty, 1964. Fluorescent studies in the genus *Clostridium*, II A. rapid method for differentiating *Clostridium botulinum* types A, B and F, types C and D, and type E. *J. Appl. Bacteriol.* 27:140-142.

ENFERMEDADES INFECCIOSAS.

- Bornstein, D. L., Weinberg, A. N. Swartz, M. N. and L. J. Kunz. 1964. Anaerobic infections-review of current experience. *Medicine.* 43:207-232.

- Egerton, J. R. and P. D. Walker, 1964. The isolation of *Clostridium perfringens* type C. from necrotic enteritis of man in Papua-New Guinea. *J. Pathol. Bacteriol.* 88:275-278.
- Heath, C. W. Zusman, J. and I. L. Sherman, 1964. Tetanus in the United States, 1950-1960. *Am. J. Public Health.* 54:769-779.
- MacLennan, J. D. 1962. The histotoxic clostridial infections of man. *Bacteriol. Rev.* 26:177-276.
- Potvin, A. and J. E. Morin. 1957. Thirty-five cases of human anaerobic infections. *Canad. J. Public Health* 48:317-322.
- Sterne, M. and A., Thomason, 1963 The isolation and identification of Clostridia from pathological conditions of animals, *World, Symp. on Diseases caused by Anaerobes. Office Internat. Epizootics, Paris* See particularly pp. 9-11.
- Stokes, E. J. 1958. Anaerobes in routine diagnostic cultures. *Lancet* 1:668-670.
- Zissler, J. Rossfeld, Steinberg L. Oakley, C. L., Dieckman, C. and E. Hain, 1949. Enteritis necroticans due to *Clostridium welchii* type F. *Brit. Med. J.* 1:267-271.
- ANAEROBIOS NO ESPORULADOS.**
- De Vries, W. and A. H. Stouthamer. 1967 Pathway of glucose fermentation in relation to the taxonomy of bifidobacteria *J. Bacteriol.* 93:574-576.
- Hoogendijk, J. L. 1965. Resistance of some strains of *Bacterioides* to ampicillin, methicillin, and cloxacillin. *Antonie van Leeuwenhoek* 31:383-385.
- Leesche, W. J., Socransky, S. S. and R. J. Gibbons. 1964. *Bacteroides oralis*, proposed new species isolated from the oral cavity of man. *J. Bacteriol.* 88:1329-1337.
- Miller, L. G. and S. M. Finegold. 1967. Antibacterial sensitivity of *Bifidobacterium (Lactobacillus bifidus)*. *J. Bacteriol* 93:125-130.
- Rogosa, M. 1965. The genus *Veillonella*. IV. Serological groupings and genus and species emendations, *J. Bacteriol.* 90:704-709
- Sebal, M. Gasser, F. and H. Werner. 1965. Teneur GC% et classification. Application au groupe des bifidobacteries et a quelques genres voisins. *Ann. Inst. Pasteur* 109:251-269:
- Socransky, S. S. and R. J. Gibbons, 1965. Required role of *Bacteroides melaninogenicus* in mixed anaerobic infections, *J. Infect. Diseases* 115:247-253.
- Suzuki, S., Ushijima, T. and H. Ichinose. 1966. Differentiation of *Bacteroides* from *Sphaerophorus* and *Fusobacterium*, Japan, *J. Microbiol.* 10:193-200.
- Tynes, B. S. and W. B. Fronmeyer, Jr. 1962. *Bacteroides* septicemia. Cultural, clinical, and therapeutic features in a series of twenty-five patients. *Ann Int. Med.* 56:12-23.
- Van Haute, J. 1966. Studies on the cultivable flora of normal human feces, *Antonie van Leeuwenhoek.* 32:212-222.

CYANAMID DE VENEZUELA C. A.

DAVIS & GECK

SUTURAS QUIRURGICAS DE ALTA CALIDAD

SEDA SILICONADA A N A C A P

FLEXON

DERMALENE

SURGILON

CATGUT,

VAB - Fajas Abdominales de Diseño Exclusivo

PRE-OP = Esponjas Quirúrgicas para lavado
pre-operatorio.



Calle Chicago con Autopista del Este

California Sur

Apartado del Este 11.391

TELEFONOS: 34 35 18 34 35 19 34 91 10

C a r a c a s

JOSE F. BAUTE MESA

OFRECE A LOS SEÑORES MEDICOS
CLINICAS Y HOSPITALES
UN EXTENSO SURTIDO EN

MATERIAL MEDICO - QUIRURGICO, EQUIPOS E INSTRUMENTAL

EXHIBICION Y VENTAS:

MANDUCA A FERRENQUIN No. 136 — EDIFICIO BAUTE

TELEFONOS: 55.93.49 - 55.46.22 - 54.45.69

CARACAS, D. F.

ESTACIONAMIENTO PROPIO PARA CLIENTES

Y RELACIONADOS

eugynona

Las excepcionales características del nuevo gestágeno norgestrel permiten emplear la mínima dosificación hormonal hasta ahora conocida. La excelente tolerancia así lograda hace que sea un ovulístico perfectamente aceptado incluso por la mayoría de las mujeres que no soportan la administración de preparados similares.

Eugynona establece así una nueva norma en la ovulistasia oral.

Envase-calendario con 21 grageas conteniendo cada una 0,5 mg de norgestrel y 0,05 mg de etinilestradiol.

Consúltese la dosificación, advertencias y contraindicaciones en nuestros impresos más detallados.

Schering AG Berlín/Bergkamen

nuevo
ovulístico oral

rayano
en la perfección



Pentrexyl Gotas Pediátricas

(ampicilina)

Le permite a usted prescribir dosis bactericidas precisas para lactantes

🔹 **Terapia bactericida de amplio espectro.**
Combate la otitis media, aguda y recurrente, así como otras infecciones bacterianas comunes.

🔹 **Los gérmenes invasores más frecuentes en pediatría – incluso el problemático *Haemophilus influenzae* – son muy sensibles.**

🔹 **Conveniente medicación, fácilmente aceptada por su sabor a frutas. Frascos de 10 mL, 100 mg/mL con gotero calibrado.**

¡nuevo!



Pentrexyl

250
mg.

intravenoso



detiene el proceso séptico
desde el comienzo



LAURIMICINA

LAURILSULFATO DE ERITROMICINA PROPIONATO

antibiótico que ofrece
seguridad

antibioterapia
más rápida
más eficaz
más segura

PRESENTACION



Frascos x 12 cápsulas de Laurilsulfato de Eritromicina propionato, equivalente a 250 mgs. de Eritromicina base por cápsula.



Frasco de 60 cc. de suspensión oral conteniendo Laurilsulfato de Eritromicina propionato, equivalente a 1,5 gms. de Eritromicina Base — tiene una concentración de 25 mg/ml. x cada cc.

FARMACO ESPECIALIDADES S. A.



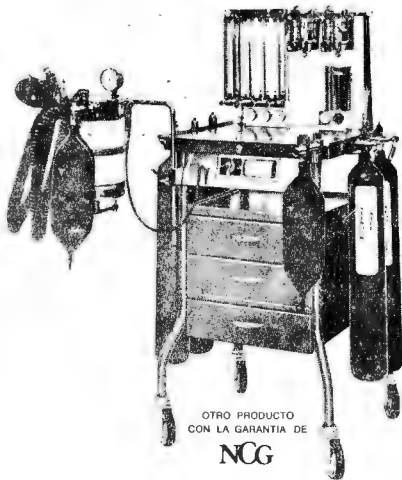
Winthrop

Medicinas de Confianza al Servicio del Médico

GIV

LA MAQUINA DE ANESTESIA "QUANTIFLEX" DE NCG SEGURA Y DE FACIL MANEJO

Preparada para adaptarle ventilador y otros accesorios. Para usar con gases oxígeno, óxido nitroso y ciclopropano. Vaporizadores Fluotano y Pentano. Concentrador de Gases y Absorbedor para usarlo independiente o en instalaciones centrales.



OTRO PRODUCTO
CON LA GARANTIA DE

NCG

- Unidades de emergencia
- Ventiladores
- Equipos para Oxigenoterapia
- Máscaras
- Cateles nasales
- Incubadoras
- Tiendas de oxígeno refrigeradas por hielo
- Tiendas infantiles para terapia de aerosol
- Resucitadores

- Reguladores de presión
- Absorbedor Baralyme
- Instalaciones de sistemas completos de controles de oxígeno, óxido nitroso, succión y aire comprimido.
- Sistemas de oxígeno-aire proporcionado para retenes de prematuros.
- Aparatos para salas de recuperación y unidades de terapia intensiva.

Consulte nuestro Departamento Técnico sin compromiso.

GIV

Grupos Industriales

C.A. GASES INDUSTRIALES DE VENEZUELA

CARACAS: Edif. Triq - 1er. Piso, Plaza Sur Altamira
Teléfonos: 33.53.81 - 33.53.82 - 33.53.83

MARACAIBO - VALENCIA - MARACAY - BARQUISIMETO
PUERTO ORDAZ - PTO. FIJO - SAN JOSE DE GUANIPA



American

**HOSPITAL SUPPLY CORPORATION
DE VENEZUELA C. A.**



EQUIPOS DE REHABILITACION
TERAPIA OCUPACIONAL
DIAGNOSTICO
APARATOS PARA EJERCICIOS

Sillas de Ruedas

Edificio La Hacienda. Oficina 31-L
Teléfonos: 33-63-05 y 33-59-01
Avenida Principal de Las Mercedes
Caracas - Venezuela

Los Costos del Servicio de Hospitalización, con Especial Referencia al Hospital Privado "Centro Médico de Caracas"

Por: Dr. Jorge Soto-Rivera.

Con frecuencia se viene hablando recientemente de los costos en aumento de los servicios de hospitalización en hospitales privados y se opina de muchas y muy distintas maneras al respecto. Parece como si cada uno tuviera su propia manera de "enfocar" el porque de la cuestión, ofreciéndose opiniones que lejos de aclarar parecen hacer más confuso el asunto.

Es por eso, que muy en contra de nuestra costumbre, nos hemos visto en cierta forma moralmente obligados a hacer una pequeña exposición con la esperanza de que pueda servir de orientación a la opinión pública.

Existen factores evidentes, quizá poco conocidos o apreciados, que influyen en el costo creciente de los servicios de hospitalización en general, gubernamentales o privados y no tan solo en hospitales privados.

Entre esos factores mencionaremos en primer lugar, el aumento habido en los últimos años en las cargas contributivas, del Impuesto Sobre la Renta, de la cotización del Seguro Social y otros, así como los aumentos de algunos servicios públicos tales como: agua, teléfono, aseo y otros, que no por ser "justos" han dejado de constituir un factor de aumento en el costo de funcionamiento de los hospitales.

El ajuste en la cifra del cambio con el dólar Americano, hecho ya hace algunos años, aumentó en un 40% el costo del material Médico-Quirúrgico, instrumental, equipos y suministros de importación.

Las medidas tendientes a la industrialización del país, con diferencias aún mayores entre el producto importado y el de manufactura Nacional, en muchos de los renglones de consumo diario tales como: algodón, adhesivo, guantes quirúrgicos y tantos otros, han sido factores evidentes de aumento en los costos de funcionamiento de los hospitales, tanto públicos como privados.

Sin embargo aún cuando dichos factores han sido evidentemente causa en el aumento de los costos, el factor más importante a nuestro juicio, lo constituye el costo creciente del personal.

En primer lugar debemos de recordar que en el presupuesto de funcionamiento de cualquier hospital, PUBLICO O PRIVADO, el renglón de pagos al personal constituye el 70 al 80% de los gastos . . . y de allí que el "insumo" más costoso en esta industria "sin chimeneas" que constituyen los hospitales, sea el presupuesto de la "mano de obra".

Así se explica la noción, producto de la experiencia, que nos señala que dentro de líneas generales el costo de funcionamiento anual de los hospitales es sensiblemente igual al 25% de lo que costó su construcción y equipamiento . . . o sea, que si un hospital costó racionalmente en construcción y equipos la cantidad de Bs. 20.000.000,00 la cifra de su costo de funcionamiento anual estará en los alrededores de Bs. 5.000.000,00.

En lo que se refiere específicamente al Hospital Privado "Centro Médico de Caracas", con un total de 80 camas en servicio y una nómina de 240 trabajadores, la proporción resulta en tres (3) trabajadores por cama en servicio. El personal profesional para-Médico es de número y calidad elevados. Solamente en el renglón de Enfermeras Profesionales el número se eleva a treinta, proporciones que difícilmente podrían compararse con otros hospitales públicos o privados.

Periódicamente, cada uno a tres años, el personal, para quienes también ha aumentado el costo de la vida, aspira lógicamente a mejores condiciones de trabajo, y los nuevos Contratos Colectivos, implican nuevas y cada vez crecientes responsabilidades económicas del hospital para con sus trabajadores en general, incluyendo el personal para-Médico: Bio-Analistas, Enfermeras Profesionales y otros.

Desde este punto de vista, el Contrato Colectivo de Trabajo que mantenemos entre otros con el Sindicato de Trabajadores de la Salud del Distrito Federal y el Estado Miranda, es considerado sin discusiones y unánimemente entre las partes como "modelo de su género". Un Contrato Colectivo que pueda ser considerado como "modelo" forzosamente implica una alta carga económica.

El mencionado Contrato Colectivo, además de contener cláusulas de índole netamente económicas contiene otras de muy avanzado beneficio social, que no por ello deja de representar responsabilidades de índole económica de consideración.

Entre ellas mencionaremos a título de ejemplo, los aumentos de 10% del sueldo BRUTO por nacimiento de cada hijo, contribuciones para los gastos de entierro para el trabajador y para una amplia lista de familiares inmediatos que incluye concubina, con permisos remunerados al trabajador, que de acuerdo con las distancias al sitio del deceso llegan hasta ocho días calendario, aportes por matrimonio con permiso de diez días remunerados, pago por el hospital de la tercera parte faltante del salario que no paga el Seguro Social en los casos de reposo, reparto del 25% de utilidades con garantía de 18 días de salario como mínimo, horarios diurnos de 6 horas y nocturnos una noche sí y otra no. ESTABILIDAD TOTAL en el trabajo y tantas otras más.

Algunas de ellas merecen una consideración para los fines de esta información como sigue:

La tercera parte del salario, que no paga el Seguro Social en los casos de reposo y que el hospital se compromete a financiar, constituye una carga económica de consideración, mucho más si se recuerda que dicha cláusula trae automáticamente aparejada un aumento considerable en el ausentismo por reposos concedido por el Seguro Social.

Los horarios corridos de seis horas (7 a. m. a 1 p. m. y 1 p. m. a 7 p. m.) con la media hora para comidas que establece la Ley del Trabajo en horarios corridos de cinco horas en adelante, trae aparejada forzosamente un aumento del personal por disminución del número de horas-hombre de trabajo. En este horario están incluidas las Enfermeras Profesionales, Auxiliares de Enfermería, Camareras y otros.

Los horarios nocturnos de 7 p. m. a 7 a. m. con CUATRO horas de reposo y en forma alterna: una noche sí y otra no, con día y medio libre entre cada guardia nocturna, trae aparejada la necesidad de DUPLICAR el personal del turno nocturno de Enfermeras Profesionales, Auxiliares de Enfermería, Camareras y otros.

LA ESTABILIDAD TOTAL, de que disfrutaban los trabajadores del Centro Médico desde principios de 1958 (100%) a partir de los treinta días de prueba a que se refiere la Ley del Trabajo, trae como consecuencia la imposibilidad de reducción del personal durante períodos y épocas en que el promedio de ocupación cae a niveles de 25%, debiendo mantenerse en todo momento el 100% del personal necesario para las 80 camas.

Las únicas causas de despido contenidas en la cláusula de la estabilidad, están contenidas en el artículo N° 31 de la Ley del Trabajo vigente, y aún así quedan sujetas a confirmación por un Comité tripartito.

A título de información, copiamos a continuación las previsiones del mencionado artículo N° 31 de la vigente Ley del Trabajo, como sigue:

"Son causas justificadas de terminación del contrato por voluntad unilateral del patrono los siguientes actos del trabajador:

- a) Falta de probidad, vicios de hecho, injurias o conducta inmoral en el trabajo;
- b) Perjuicio material causado intencionalmente o con negligencia grave en las maquinarias, herramientas y útiles de trabajo, mobiliario de la Empresa, materias primas o productos elaborados o en elaboración, plantaciones y otras pertenencias;
- c) Omisiones e imprudencias que afecten a la seguridad e higiene industriales;
- d) Inasistencia injustificada al trabajo durante tres días hábiles en el período de un mes.

Se considera causa justificada de inasistencia al trabajo, la enferme-

dad del trabajador. Este deberá siempre que no exista circunstancia que lo impida, notificar al patrono la causa que lo imposibilite para asistir al trabajo;

- e) Faltas graves a las obligaciones que le impone el contrato de trabajo;
- f) Faltas graves al respeto y consideración debido al patrono, a los miembros de su familia que viven con él o a los representantes del patrono;
- g) Revelación de los secretos de manufactura, fabricación o procedimiento, cuya divulgación perjudique los intereses del patrono, y
- h) Abandono del trabajo".

Por otra parte, si un hospital privado como el nuestro, mantiene la norma de prestar al público un servicio médico oportuno y de la más alta calidad posible, es necesario que durante las 24 horas del día y durante 365 días al año, estemos en posibilidad de servir eficientemente a cualquier paciente cuya atención se nos confie.

Por lo tanto se hace necesario mantener guardias de servicio permanente, durante los Sábados por la tarde, Domingos, Feriados de día y de noche, tanto de Médicos Residentes (cuyos servicios al paciente hospitalizado SON GRATUITOS en nuestro hospital) como de Bio-Analistas, Técnicos de Rayos X, Enfermeras de Hemoterapia (Servicio de Transfusión) y tantos otros, cuyas guardias permanente es necesario pagar con el recargo correspondiente a los días de asueto y al trabajo nocturno, sin que los servicios que prestan se vean ni remotamente compensados con los recargos que se hacen en las oportunidades en que se utilizan.

En nuestro hospital, y de acuerdo con las más elementales normas de ética hospitalaria, UN SOLO CASO DE EMERGENCIA AL AÑO que pueda ser atendido oportunamente y en forma altamente eficiente justifica más que ampliamente el alto costo de los servicios permanentes de guardia . . . pero no por ello dejan de ser altos los costos de mantenimiento y absolutamente despreciables los ingresos por dicha causa.

Agréguese a ello el mantenimiento de una lista muy completa de Médicos especialistas en guardia de disponibilidades para la atención de casos de emergencia.

Si bien es verdad que el mantenimiento de una norma de alta calidad y oportunidad de servicio implica también la inversión de grandes sumas en materia de instalaciones y equipos especializados cada vez más costosos por el tremendo avance de la Ciencia Médica en los últimos años, dichas instalaciones y equipos están sujetos a depreciación, resultando su costo en materia de gastos, el equivalente a la proporción años dependiendo de su plazo de vida estimado.

A título de ilustración, Valdría la pena mencionar aquí, lo relativo a las Unidades de Cuidado Intensivo, cuya dotación de personal alta-

mente especializado, hacen llegar las cifras de costo de funcionamiento dentro de los hospitales gubernamentales a cantidades que fluctúan entre Bs. 700,00 y Bs. 1.000,00 por cama y por día. . .

Si un hospital privado mantiene la norma de ofrecer la más alta calidad de servicios y la oportunidad del servicio, forzosamente cae en **MAS ALTOS COSTOS** de funcionamiento. Dicho en otra forma, el funcionamiento de un hospital privado, dentro de las condiciones mencionadas, constituye la más pobre inversión que pueda hacer un inversionista cualquiera: como negocio es malo.

Si llegara a existir "una utilidad", no se puede pensar ni remotamente en un reparto de dividendos a los accionistas. Las utilidades si las hay deben ser forzosamente re-invertidas en ampliaciones, servicios y equipos de alto costo, a que obliga el mantenimiento de una "norma de calidad" y de "oportunidad" de los servicios que se prestan.

Si tan sólo se aparentara buen servicio (condición cuya apreciación no está al alcance del público en general que usa esos servicios) y aún tomando en consideración que en casos de urgencia fuera de las horas regulares de trabajo el servicio no es oportuno ni de la calidad deseable en dichos casos, podría la inversión resultar negocio. Un negocio a expensas de la salud de los demás. . .

Desdichadamente no contamos aún en Venezuela con una organización gubernamental o privada que pueda avalar al público en general la calidad del servicio que ofrecen los diferentes hospitales. A nuestro mejor conocimiento, la única norma legal vigente al respecto está contenida en el "Reglamento de Clínicas y casas de salud" promulgado en 1938 por el entonces Presidente de la República General Eleazar López Contreras, el cual está muy lejos de constituir una norma siquiera mínimamente adecuada para 1969.

Hatemos muchos que tenemos esperanzas de una eficiente organización privada que pueda tomar a su cargo estas funciones, que en la actualidad constituye el objetivo de un grupo de técnicos y expertos en administración de hospitales que constituyó recientemente la Asociación Venezolana de Hospitales.

Como datos comparativos mencionaremos que en un hotel de "buen servicio y oportunidad del mismo" como tantos que hay en existencia en Caracas, el valor de un cuarto fluctúa entre Bs. 60,00 y Bs. 200,00 diarios, sólo para dormir, sin comida. Otros servicios como bares, restaurantes, clubes nocturnos y demás, funcionan con producción de una utilidad económica.

Un cuarto cualquiera de un hospital privado, cuyo valor diario sea de Bs. 100,00 es automáticamente titulado de **CARO**. Comparativamente no se aprecia que además del cuarto (de uso permanente) en ese valor están incluidas las tres comidas (muchas veces de tipo especial por con-

sideraciones dietéticas), el servicio permanente de profesionales y auxiliares de enfermería, y el respaldo de toda una organización médica especializada.

Lógicamente, todo aumento en los costos de funcionamiento de un hospital privado incide en las tarifas establecidas de valor diario del cuarto. No hay otra alternativa. El número de cuartos en servicio es igual. El porcentaje de ocupación es primordialmente el mismo. No hay ampliación en el número o en la utilización de los servicios que pudiera absorber el aumento de los costos. Las medicinas son cargadas al paciente hospitalizado y ambulatorio a los precios de venta autorizados por el Ministerio de Fomento.

Según decreto del mismo Ministerio, los pacientes tienen el derecho de recibir una lista de comprobantes de las medicinas que ha recibido durante su hospitalización y el valor a que les han sido cargadas las mismas.

En nuestro hospital todo paciente que se acepta para hospitalización, recibe junto con otra información que pueda resultarle de interés, una copia del mencionado Decreto N° 676 de fecha 5 de Marzo de 1964 del Ministerio de Fomento, que textualmente dice como sigue:

Por cuanto es deber del Gobierno Nacional velar porque los artículos y servicios de primera necesidad se mantengan, dentro de los límites razonables, al alcance de toda la población del país;

Por cuanto dentro de este espíritu han sido regulados por este Despacho, en diversas Resoluciones, todos los productos farmacéuticos que se expenden en el territorio nacional;

Por tanto de conformidad con lo dispuesto en el N° 1, letra a), del artículo 9° del Decreto N° 176 del 15 de Agosto de 1944, en concordancia con los artículos 2° del Decreto N° 421 del 27 de Junio de 1952 y 20. del Decreto N° 455 del 23 de Enero de 1961, y en uso de las atribuciones a que se refiere el ordinal 9° del artículo 22 del Estatuto Orgánico de Ministerios, por disposición del ciudadano Presidente de la República.

R E S U E L V E

ARTICULO 1º.—Las clínicas, hospitales y demás institutos donde se preste asistencia médica a cambio de un precio, quedan obligados, al presentar sus cuentas al paciente o a sus representantes a discriminar y especificar en lista anexa lo correspondiente a medicinas que se hubiesen suministrado, las cuales deberán cobrarse a los precios establecidos por este Despacho, de acuerdo a las Resoluciones Vigentes.

ARTICULO 2º.—Las infracciones a las disposiciones de la presente Resolución serán sancionadas con multas de Bs. 20,00 a Bs. 10.000,00.

ARTICULO 3º.—De estas sanciones podrá apelarse por ante el Ministerio de Fomento durante los cinco días hábiles siguientes a su imposición.

ARTICULO 4º.—La presente Resolución entrará en vigor en la fecha de su publicación en la GACETA OFICIAL.

Comuníquese y publíquese.

Dr. Hugo Pérez La Salvia.

Ministro de Fomento.

Desdichadamente, en el Decreto que antecede, no se estableció al propio tiempo la "obligatoriedad" de entregar una copia del mismo a todo paciente hospitalizado, condición ésta que en forma espontánea venimos cumpliendo en nuestro hospital. Y digo "desdichadamente" porque es bien conocido de todos que en nuestro país la mayor novedad dura ocho días . . .

Si se trata de un hospital gubernamental, todo aumento en los costos de funcionamiento se refleja en el correspondiente presupuesto gubernamental.

Continuando dentro del plano comparativo, el costo de una cama de hospitalización en los hospitales de U.S.A. es de 70,00 dólares diarios. Estos costos han venido aumentando en el curso de los últimos años en una proporción de 12% anual.

Contra lo que pudiera suponerse la inmensa mayoría de los hospitales norteamericanos son de propiedad "privada" Los costos mencionados son posibles aún, por las donaciones que reciben. Mantienen un alto porcentaje de ocupación. Pagan todos los que los utilizan? . . . La proporción de los que pagan directamente los servicios es despreciable por ínfimo. Hay otro que paga las tarifas completas por la inmensa mayoría. El Blue Cross, El Blue Shield, El Medicare, El Medacaid y tantos otros.

En definitiva hay siempre UN TERCERO QUE PAGA. El sentido del Seguro privado está ampliamente desarrollado en la ciudadanía y todos contribuyen mensualmente entre otras previsiones con una cantidad determinada para pagar de alguna forma el Seguro de Hospitalización. Cuando se necesita el servicio, poco importa la tarifa o los aumentos habidos: el Seguro Privado paga por ellos.

Hay que reflexionar sobre todo esto. Es necesario construir una conciencia pública e individual sobre el Seguro de Hospitalización. Según los porcentajes de aumento anual en los costos de funcionamiento de los hospitales, los costos se verán forzosamente duplicados en un período de menos de 10 años. No mencionamos siquiera el reto planteado a la humanidad para el año 2.000. . .



C O R T E S I A D E L
“ G R U P O D R O L A R A ”

A N O M B R E D E

DROGUERIA LARA C. A. - Barquisimeto

DROGUERIA LARA CARACAS C. A.

INVERSIONES DROLARA C. A.

ASOCIACION FARMACEUTICA LARA C. A.

FOLICOL (GRAGEAS)

MAXIMA PROTECCION DE LA CELULA HEPATICA

El FOLICOL es un producto lipótropo de concepción moderna.

Su originalidad consiste en la asociación de las sustancias lipótropas a la vitamina E y al complejo vitamínico B.

Gracias a su fórmula moderna, el FOLICOL ejerce una acción polivalente sobre la etiopatología hepática. Mientras que por una parte, trata de suprimir la esteatosis hepática, dando a las células de este órgano su función con la suministración de aminoácidos lipótropos, por otra parte protege dichas células contra las sustancias nocivas, que provienen de un metabolismo incompleto o insuficiente, que entran en la circulación.

El FOLICOL activa también la función respiratoria de las células de los tejidos, ya sea a nivel hepático como a nivel periférico, con el objeto de suprimir la insuficiencia local o general que es siempre susceptible de repercutir en las funciones hepáticas.

La Metionina suministra los metilos labiles y protege, gracias a los grupos SH de que dispone; las funciones óxido-reductoras que tanta importancia tienen en los tejidos hepáticos.

La Colina ejerce una acción lipótropa importante en el nivel del hígado, atenuando los daños causados por una alimentación rica en grasas.

La Vitamina E protege el tripéptido de los fenómenos de oxidación, fortificando y alargando, al mismo tiempo, el radio de acción.

La Vitamina B12 y el Acido Fólico, actúan como reguladores del metabolismo de las purinas y permiten el mantener la fórmula eritrocitaria a un nivel bastante elevado.

La Vitamina B1 es un coadyuvante indispensable en toda terapéutica hepática, ya que activa los procesos metabólicos relativos a la oxidación de los glúcidos que, de otra forma, se detendrían en los productos intermediarios de carácter ácido.

La Vitamina B2 es un factor esencial en todo proceso de óxido-reducción.

La Vitamina PP tiene un papel muy importante en la respiración celular como constituyente esencial de la cozymasis. Su carencia provoca una alteración del metabolismo de la hemoglobina resultando una acumulación y hematorporfirina en el hígado.

FORMULA: Cada gragea contiene:

Dl"Metionina	100	mgrs.
Colina Tartrato	100	"
Vitamina B1	2	"
Vitamina B2	2	"
Vitamina B6	2	"
Vitamina B12	2	mcgrs.
Vitamina H (Biotina)	0,1	mgrs.
Vitamina E	3	"
Acido Fólico	0,5	"
Niacinamida	6	"
Acido Pantoténico	3	"

INDICACIONES:

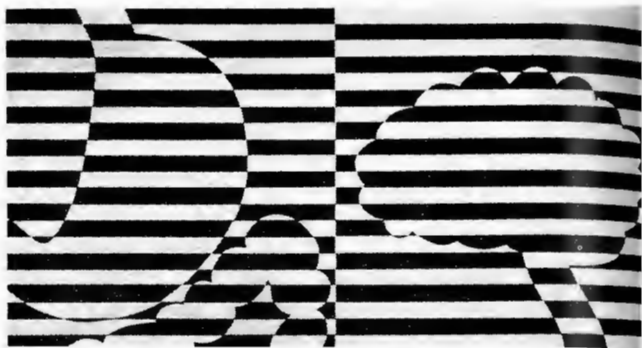
Insuficiencias hepáticas - Hepatitis - Cirrosis - Esteatosis - Intoxicaciones hepáticas - Ictericia - Ateromatosis aórtica - Arterioesclerosis de las coronarias - Arterioesclerosis general - Hipercolesterinemia - Diabetes y sus complicaciones vasculares - Obesidad.

Laboratorios ROYAL, c. a.

Piedras a Bárcenas, 2-1 — Apartado 3370

Teléfono: 42.27.72

Caracas - Venezuela



Trastornos
gastrointestinales
funcionales . . .

A menudo atribuibles
a factores
emocionales . . .

A menudo tratables con

Tabletas 10 mg/100 mg

TRYPTANOL *

clorhidrato de amitriptilina MSD

El antidepresivo con un
componente tranquilizante inherente

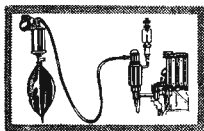
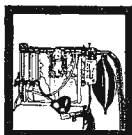
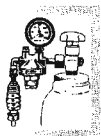
NOTA: Información detallada a solicitud del médico.



MERCK SHARP & DOHME DE VENEZUELA, C.A.

Afilada de Merck Sharp & Dohme International
DIVISION OF MERCK & CO. INC.
Rahway, New Jersey U.S.A.

el aparato de anestesia
 más completo
 (y más sencillo)
 que se conoce...



AGA lo hizo

La completa serie de aparatos de anestesia de AGA - UNIVERSAL, CENTRAL, MILITAR y PORTATIL - ha sido fabricada dentro de los más estrictos requerimientos de la ciencia médica, no obstante su sencillez y simplicidad de manejo.

- Pueden emplearse para todos los sistemas de circulación y "ro-and-fro"
- Permiten numerosas combinaciones de gases: O₂, N₂O, C₃H₆, éter, fluorano y trifenilo.
- Simples y de fácil manejo, gracias a su estudiada construcción.
- Muy baja resistencia a la respiración
- Eficaces dispositivos de seguridad contra explosiones o infecciones cruzadas.
- Partes contaminables pueden esterilizarse *in situ*.
- Válvula adicional de oxígeno para aumentar la dosificación si se necesitara.
- Dispositivo de inyección-succión insertado, a prueba de chispas.
- Conexiones de acople rápido, no intercambiables, lo que permite un rápido y seguro cambio de cilindros y conexión a las tomas de pared.
- Todos los modelos son acoplables a un sistema central con tuberías de gas.
- Materiales de primísima calidad y trabajo suco de precisión.

Con este formidable aporte, la ciencia médica recibe la colaboración de AGA, siempre empeñada en fabricar aparatos que beneficien grandemente, tanto a la ciencia en sí, como a la colectividad.

AGA PRIMEROS TAMBIEN EN
 APARATOS DE ANESTESIA

30 comprimidos de 10 mg.

Ritalin®

C I B A

Psicotónico



Bibliografía:

JACOBS, V. (1959) 'The Use of Ritalin in Psychotherapy of Depressions of the Aged', *Psy. Bull. Quart.*, **32**, 496.

JAFFÉ, G. V. (1961) 'Depression in General Practice: A Clinical Trial of a New Psychomotor Stimulant', *Practitioner*, **186**, 492.

JAFFÉ, G. V., and BERTHO, J. (1961) 'The Treatment of Anxiety with Ritalin and Methyl Phenidate', *Practitioner*, **191**, 506.

MAGE, M. L., and KOVITZ, B. (1956) 'Experiences with Methyl Phenidate Hydrochloride (Ritalin) in Psychotic Patients', *Archives Gen. Psy. Ther.*, **3**, 309.

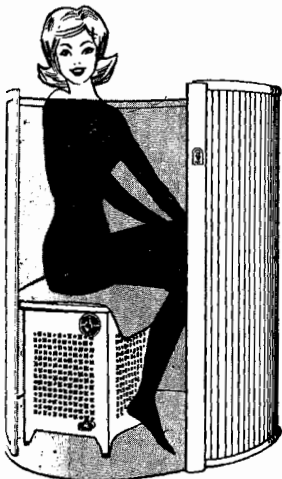
MISKE, R., GRUBB, F., and THOMPSON, J. (1954) 'Ritalin: A New Synthetic Compound with Specific Action on the Central Nervous System', (Original in German), *Klin. W. ch.*, **32**, 445.

NEVENSANG, A., JR. (1956) 'Clinical Evaluation of Ritalin: A New Psychomotor Stimulant', *Dis. Nerv. Syst.*, **17**, 392.

SCOTT, J. T., and DRISCOLL, J. H. (1962) 'Acute Alcoholic Intoxication: Use of Methyl Phenidate', *Am. Practitioner*, **11**, 84.

SAUNA CASERA

En su propio hogar, en cualquier momento con poco gasto, Ud. puede obtener resultados maravillosos en beneficio de su salud, tomando un baño de vapor. El valor terapéutico de los baños en el SAUNA es conocido desde hace miles de años por los pueblos de la antigüedad.



SAUNA CASERA

es un producto alemán, recomendado mundialmente para:

Balancear la tensión nerviosa tras un día agitado.

Normalizar un eventual sobrepeso
Normalizar Dificultades de la circulación.

Obtener un sueño reparador.

Eliminar la grasa de los poros.

Combatir dolores de reumatismo y artritis.

Combatir dolores de la articulación.



El **SAUNA CASERA** se compone de una cabina con termómetro y una silla que incluye los elementos de irradiación infrarroja invisible. El aparato tiene el sello de aprobación de la Unión de Ingenieros Alemanes.

Pida una demostración en nuestros locales de exhibición.

Si piensa en su salud, piense en la Casa Heymann.

DISTRIBUIDOR:

R. HEYMANN K.

Ave. Vollmer - San Bernardino
Teléfono: 55 84.44 - CARACAS

Behrens

GABINETE OPTICO DE M. BEHRENS & C. O. SUCR. C. A.

Pioneros de la Optica en Venezuela - Fundada en el Año 1916
(Esquina Mercaderes).

LA SEGUNDA GENERACION EN EXPERIENCIA Y GARANTIA



ANOS AL SERVICIO DE SUS OJOS

NO SE CONFUNDA

Este Emblema



En Forma de Arco Distingue a
Nuestras Sucursales en Todo el País

CARACAS

CASA PRINCIPAL
Misericordia a No Pastor N° 62
Teléfonos:
55.16.80 - 55.72.33 y 54.31.92

CENTRO
Esq. Miracielos
Teléfono: 42.49.37.

ESTE
Calle Real de Sabana Grande
Edificio Anzoátegui
(Al lado Abasto Oporto)
Teléfono: 71.74.77.

PARAISO
Avenida Páez.
Fte. Viejo Hipódromo.
Teléfono: 41.17.82.

INTERIOR

VALENCIA
Calle Díaz Moreno
Avenida 101 — 104 — 58
Teléfono: 82.551.

BARQUISIMETO
Edificio Ayacucho
Calle 25
Teléfono: 20745.

Recuerde visitar por lo menos una vez al Año a su Médico Oftalmólogo con confianza que nuestros Gabinetes le ejecutan con rapidez y precisión su fórmula médica. Nuestras sucursales tanto en Caracas como en el interior atienden a los afiliados del Seguro (I.V.S.S.O.) I.P.A.S.M.E. y Ministerio de Minas e Hidrocarburos.