

---

## PROPIEDADES QUIMICAS E INMUNOLOGICAS DE LAS PROTEINAS M y T DE LOS *Streptococcus hemolyticus* DEL GRUPO A (Revisión de los últimos conocimientos)

---

JORGE OLARTE  
Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, México. D. F.

Los *Streptococcus pyogenes* (Bergey, 3) o *Streptococcus hemolyticus* del grupo A de Lancefield constituyen uno de los microorganismos más complejos dentro de las bacterias patógenas del hombre, tanto desde el punto de vista de su estructura antigénica como de su capacidad para producir toxinas y enzimas.

Entre los antígenos tenemos el polisacárido que les da la especificidad de grupo, conocido como antígeno o sustancia C; la nucleoproteína P que se encuentra también en *Streptococcus viridans*, en algunos neumococos, en *Staphylococcus aureus* y otros microorganismos; el antígeno Y de Heidelberger, y las proteínas M y T específicas de tipo (7, 8, 9 y 13).

Se han descrito las toxinas y enzimas siguientes: las hemolisinas o estreptolisinas S y O, la primera lábil al calor y a los ácidos, la segunda sensible al oxígeno el cual la inactiva; la fibrinolisisina de Tillet o estreptokinasa; la leucocidina; el factor de permeabilidad tisular de Duran-Reynolds que conocemos actualmente como hialuronidasa; la toxina eritrogénica o escarlatínica; la enzima proteolítica de Elliott (4, 5 y 7).

En la clasificación de los estreptococos se ha recurrido a los más diversos criterios. Desde el morfológico, longitud de las cadenas, presencia de cápsulas, "habitat", solubilidad a la bilis, reducción del azul de metileno, resistencia al calor. La clasificación de Schottmüller (13e) basada en las observaciones de Marmorek (13d) acerca de la actividad hemolítica y la clasificación de Andrewes y Horder (13a), con sus subsecuentes modificaciones, utilizando la fermentación de carbohidratos, son usadas hasta el presente sin que ninguna de las dos sirva para precisar o definir especies o tipos dentro del género, limitándose su utilidad a la determinación de algunos caracteres de grupo.

Numerosos estudios relacionados con las propiedades serológicas de los estreptococos indicaron la existencia de antígenos específicos, pero la falta de coordinación en los resultados obtenidos dieron lugar a una situación todavía más confuso.

Empleando reacciones de aglutinación, Griffith, en 1926 (13b), consiguió hacer un análisis más completo de los estreptococos de origen humano, encontrando que cada uno de los tipos de este grupo posee antígenos específicos capaces de individualizarlos por medio de la aglutinación y absorción de aglutininas. Así tuvimos el primer esquema o clasificación antigénica.

Dos años más tarde, Lancefield (13c) enfocó el mismo problema con técnicas diferentes. Preparó extractos para reacciones de precipitación determinando la existencia de un polisacárido somático al que llamó antígeno C. Esta sustancia permite agrupar a todos los estreptococos en once grupos denominados con las primeras letras del alfabeto. Es interesante observar que la sustancia C presenta su especificidad de grupo en correlación con el "habitat" u origen de los estreptococos. Así, por ejemplo, al Grupo A corresponden los de origen humano, al Grupo B los de las mastitis bovinas, etc., siendo aparentemente constante esta relación de especificidad entre antígeno y huésped.

Dentro del Grupo A Lancefield encontró que se puede hacer una diferenciación o individualización específica de tipos por medio de la precipitación, correspondiendo más o menos al esquema de aglutinación de Griffith. Los antígenos responsables de esta especificidad resultaron ser distintos de la sustancia C de grupo, pero se creyó que el antígeno que reaccionaba en las aglutinaciones específicas de Griffith era la misma sustancia responsable de la precipitación de Lancefield, a la que se dio el nombre de sustancia M.

Posteriores estudios han venido a demostrar que existen dos antígenos específicos en cada tipo, con características diferentes, químicas y serológicas, bien establecidas. Uno es responsable de la precipitación y el otro de la aglutinación. Para el primero se ha conservado el nombre de antígeno M; al segundo se dio el de

antígeno T (8 y 9).

#### *Características del antígeno "M" (8, 10, 11, 14 y 15)*

Lancefield demostró desde el principio la naturaleza proteica de la sustancia M, valiéndose de pruebas enzimáticas como la digestión por la tripsina y la pepsina.

El único método que hasta el presente ha permitido obtener el antígeno M a partir de las células, consiste en la extracción por medio de ácido clorhídrico N/20 y calentamiento, seguido por neutralización con sosa cáustica. La sustancia M queda en solución en el sobrenadante.

En estos extractos la proteína conserva sus propiedades antigénicas y su capacidad de reaccionar específicamente con los sueros homólogos.

Zittle (14) logró aislar de estos mismos extractos, por medio de precipitación fraccionada con sulfato de amonio, la proteína M libre de ácido nucleico, al cual se halla ligada por medio de fuerzas polares formando compuestos del tipo de los llamados nucleatos de proteína. También es posible separar estas dos sustancias por medio de electroforesis ya que su movilidad es bastante diferente, siendo este método aplicable a la purificación de la proteína M (15).

Pappenheimer et al (11) estudiaron las constantes de difusión, la velocidad de sedimentación en la centrifuga de Svedberg y el volumen específico parcial, encontrando que su peso molecular es de 41,000. La relación de sus ejes es de 1 a 25 lo que indica que se trata de una molécula alargada, representando posiblemente la forma abierta de una molécula más compleja y de tipo más esférico en su estado nativo.

Las soluciones de la proteína M presentan alta viscosidad, como corresponde a la relación de sus ejes. Su punto isoeléctrico es 5.4. Es del tipo de las proteínas alcohol-solubles. Su peso molecular y solubilidad la colocan en el grupo de la zeína.

La pepsina, tripsina y en general las enzimas proteolíticas la digieren fácilmente destruyendo todas sus propiedades antigénicas.

Es resistente al calentamiento a 100 grados centígrados y al ácido clorhídrico hasta una concentración que produzca un pH de 2 a 3.

Inyectada al conejo se muestra como un antígeno pobre tanto al estado puro como en la célula total, dando origen a la producción de anticuerpos, principalmente precipitinas, completamente específicos de tipo. Estos anticuerpos tienen poder protector igualmente específico.

La proteína pura o en la célula bacteriana es capaz de inducir anticuerpos que protegen activa y pasivamente al ratón contra infecciones por estreptococos virulentos del mismo tipo. Esta propiedad parece ser exclusiva de la proteína M no siendo presentada por ninguno de los otros antígenos aislados de los estreptococos hemolíticos del Grupo A: polisacáridos C, nucleoproteína P. proteínas T e Y.

Además de esta capacidad protectora, la proteína M tiene estrecha relación con la virulencia. Sólo las cepas virulentas la poseen. Al perderse la virulencia el estreptococo deja de sintetizar la proteína M y viceversa. Su producción puede ser incrementada exaltando la virulencia del cultivo por inoculación al ratón (8).

Su localización en la célula está circunscrita a la superficie de la misma, aunque no tiene ninguna relación con la existencia o no de cápsula. Se encuentra ligada fuertemente a alguna estructura del cuerpo bacteriano, como puede deducirse de la dificultad para obtenerla en solución, siendo necesarios tratamientos tan drásticos para una sustancia proteica, como la acción del calor y ácido clorhídrico.

En preparaciones sónicas es fácil demostrar los antígenos C y T en solución en gran cantidad; en cambio la proteína M continúa ligada a otras estructuras, no reaccionando estas preparaciones con los sueros precipitantes anti-M.

#### *Características del Antígeno "T" (8, 9 y 10).*

La obtención del antígeno T a partir de las células presenta dificultades. Como en el caso del antígeno M el único método reportado ha sido ideado por Lancefield y Dole (9). Consiste en someter a las bacterias a la acción de la pepsina durante doce horas o más, con lo cual se consigue que el antígeno T pase en solución al sobrenadante, del cual se precipita por acidificación con ácido clorhídrico hasta un pH de 2.5.

El precipitado se redisuelve neutralizándolo con sosa cáustica. Este procedimiento se repite varias veces, después de lo cual se somete a la acción de la Ribonucleasa a fin de disminuir la cantidad de ácido nucleico que se encuentra en la forma libre. Se continúa la digestión por medio de quimotripsina y tripsina para librarla de otras impurezas. Finalmente, por medio de electroforesis se ha conseguido obtener pequeñas cantidades más o menos puras que no han sido suficientes para determinar las constantes físicas que permitan conocer su peso molecular.

Se trata de una proteína de punto isoeléctrico 4.5, no es soluble en alcohol y se obtiene libre de ácido nucleico

Como se desprende del método de obtención, es resistente a las enzimas proteolíticas.

#### CUADRO I

Presencia de los mismos antígenos T (o antígenos estrechamente relacionados) en diferentes Tipos específicos de *Str. hemolyticus* del Grupo A.

Reacciones de Precipitación								
Sueros anti-T preparados con las Sigüientes cadenas:		Extractos T de cepas de los tipos						
		15	17	19	23	30	47	46
Tipos con antígeno T relacionado:	Tipos							
	15	++	++	++_	+++	+++	++++	—
	17	+++	+++	+++	+++	+++	++++	—
	19	++	++_	++_	+++	+++	+++	—
	23	+++	++_	+	+++	+++_	+++	—
	30	++	++	++	+++	+++	+++	—
	47	+++	++	+++	+++	+++	++++	—
Tipos con antígeno T relacionado	Tipos:							
	4	—	—	—	—	—	—	+++
	24	—	—	—	—	—	—	+
	26	—	—	—	—	—	—	+++
	28	—	—	—	—	—	—	++
	29	—	—	—	—	—	—	+++
	46	—	—	—	—	—	—	+++

Cuadro tomado de Lancefield y Dole (9)

La proteína T es termolábil, de suerte que el método de preparación de cada uno de los dos antígenos específicos M y T sirve para destruir al otro. La digestión por pepsina y tripsina destruye rápidamente la proteína M. El tratamiento por ácido clorhídrico y calor inactiva la proteína T.

El antígeno T tanto en la célula intacta como en solución, es altamente antigénico y específico. Pero no da origen a anticuerpos protectores ni tiene ninguna relación con la virulencia encontrándose tanto en los cultivos virulentos como en los avirulentos.

Es un antígeno muy estable y constante en cualquier fase de disociación. Tanto las colonias del tipo

llamado "Matt", características de los cultivos virulentos, como las del tipo "Glossy", típicas de los avirulentos, la contienen. La proteína M sólo se encuentra en las colonias "Matt" (8).

El antígeno T en solución es capaz de inducir la producción de aglutininas a alto título, como lo hace el estreptococo total, y además da origen a precipitinas.

Los anticuerpos T no protegen activa ni pasivamente al ratón contra la infección por estreptococos virulentos homólogos, como lo hacen los anticuerpos M.

Los antígenos M y T en solución son capaces de inhibir específicamente el fenómeno de aglutinación. Lancefield y Dole (9) encontraron que el suero anti-T puesto en contacto con la proteína T homóloga en determinadas condiciones y después de cierto tiempo de incubación deja de aglutinar a los cultivos que poseen la misma substancia.

El mismo fenómeno de inhibición específica ha sido reportado por Olarte (10) tratando el suero anti-M con pequeñas cantidades de proteína M. Este fenómeno de inhibición es diferente del fenómeno de absorción o saturación específica de anticuerpos.

#### *Distribución de las proteínas M y T en los diferentes tipos que constituyen en el Grupo A (8 y 9).*

Lancefield ha demostrado que las proteínas M son totalmente específicas de tipo, no presentando ninguna reacción de precipitación cruzada entre los diferentes tipos hasta ahora reportados. En cambio, algunas de las proteínas T iguales antigénicamente o al menos estrechamente relacionadas, pueden ser encontradas repetidas en dos o más de los tipos de Lancefield dando entre ellos reacciones cruzadas de aglutinación, como puede observarse en el Cuadro I.

Teniendo en consideración este hecho así como también la relación que existe entre las proteínas M y virulencia, y el valor protector de los sueros anti-M, es evidente que la clasificación de Lancefield supera en valor y utilidad a la clasificación de Griffith.

A esto puede agregarse que el método de Griffith es impracticable en numerosas ocasiones, debido a la frecuente auto-aglutinabilidad de los estreptococos.

La identificación de un estreptococo por medio del esquema antigénico de Lancefield será siempre de valor epidemiológico, puesto que estaremos ciertos de tener un germen virulento. La identificación hecha por el método de Griffith por el contrario, nos dejará la duda de si se trata de un cultivo virulento o no, teniendo valor epidemiológico sólo en determinadas fases secundarias de este problema.

#### *Enzima proteolítica de Elliott (4, 5 y 10)*

Trabajando con cultivos de estreptococos del grupo A que no presentaban la proteína M en sus células cuando se cultivaban a 37°C., pero sí era demostrable cuando se incubaban a 22°C., Elliott (4) demostró la existencia de una enzima producida por estos cultivos, capaz de destruir tanto a la proteína M del mismo cultivo productor de la enzima como a las proteínas M extraídas de cepas heterólogas.

Si se tratan cultivos ricos en M por la enzima, el proceso presenta dos fases: en la primera la proteína es liberada de la célula pasando al medio líquido; durante la segunda tiene lugar la digestión o destrucción del antígeno.

En condiciones culturales favorables los estreptococos del Grupo A pueden elaborar en medios líquidos esta enzima extracelular. Su actividad es notablemente aumentada por la presencia de células bacterianas vivas probablemente debido a las condiciones reductoras que ellas establecen. Así, el antígeno M puede ser atacado en su propio cultivo, habiéndose encontrado en muchos casos correlación

entre la presencia de la enzima y ausencia de la proteína M.

La enzima exhibe actividad sobre la caseína, fibrina y gelatina. Su actividad es aumentada por agentes reductores como el glutatión, cisteína y ácido tioglicólico, pero no por el ácido ascórbico. Es activada por el cianuro de potasio e inhibida por el ácido yodoacético. Se trata de una enzima similar a la papaina.

Ha sido posible diferenciarla de otras enzimas y toxinas de los mismos estreptococos, como las estreptolisinas, la estreptokinasa y la toxina eritrogénica.

Existe cierta relación entre la producción de esta proteinasa y la virulencia de los cultivos para el ratón. Los cultivos virulentos no la presentan. Los avirulentos, al adquirir virulencia, pierden la facultad de producir la proteinasa. Por otro lado vimos la relación que existe entre la cantidad de proteína M y virulencia. Estos cambios en la actividad biológica sugieren la existencia de cierta interdependencia de estos fenómenos.

En un trabajo posterior Elliott (15) demostró que la proteinasa se deriva de un precursor inactivo de la enzima. Este precursor se encuentra en los filtrados de cultivos de estreptococo, pudiendo ser activado o convertido en proteinasa por la acción de tripsina a bajas concentraciones, pero no por la quimotripsina.

En las condiciones normales de los cultivos en caldo de los estreptococos la conversión del precursor tiene lugar autocatalíticamente, siendo iniciada por pequeñas cantidades de proteinasa y requiriendo condiciones reductoras adecuadas para que su actividad sea completa.

La conversión autocatalítica del precursor es inhibida por las mismas condiciones que son desfavorables para la actividad de la proteinasa: Incubación a 22° C. en vez de 37° C. o cultivo en condiciones marcadamente aerobias. También es retardada por la presencia de caseína.

El fenómeno de la activación es semejante al de la conversión del quimitripsinógeno y tripsinógeno por la tripsina.

*Las proteínas M y T en filtrados de cultivos (10).*

Tratando de obtener la proteína M en una forma más nativa y más antigénica que los extractos celulares de Lancefield, Olarte (10) encontró que cultivando los *Streptococcus hemolyticus* del Grupo A en medios líquidos adicionados de peptonas por el método de neutralización periódica (Bernheimer y Pappenheimer, 2), el antígeno M es excretado pasando en solución al sobrenadante.

A partir del sobrenadante o filtrado de estos cultivos, concentrado al vacío, es posible purificar parcialmente la proteína por medio de precipitación fraccionada con sulfato de amonio y diálisis.

La sustancia M de los filtrados, concentrada y purificada parcialmente, da fuerte reacción específica de tipo con los sueros anti-M.

CUADRO II

Inhibición específica de la aglutinación (suero anti-sobrenadante del Tipo 17 MT)

Material usado en la inhibición	Tipo 17 MT.				Tipo 30, MT.			
	Dilución del suero:				Dilución del suero:			
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:160	1:320	1:640	1:1280
Sobrenadante 17 MT	+	—	—	—	+	+	—	—

Sobrenadante 17 MT digerido con tripsina	++	++	+	—	++	+	—	—
Sobrenadante 17 MT calentado a pH 4.5	+	—	—	—	+++	+++	+++	+
Sobrenadante 17 MT digerido y calentado.	+++	+++	+	—	+++	+++	+++	+
17 M de las Células	—	—	—	—	+++	+++	+++	+
17 M de células digerido con tripsina	+++	+++	++	+				
17 M de las células calentado a pH 4.5	—	—	—	—				
Ninguno	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++

Cuadro tomado de Olarte (10)

Esta propiedad se destruye fácilmente al tratar los concentrados con tripsina, pero no es alterada por calentamiento a 100°C. a pH 4,5.

Los sobrenadantes inyectados al conejo son capaces de estimular la producción de precipitinas específicas de tipo que reaccionan, aunque a bajo título, con los extractos celulares M de Lancefield.

Estos sueros dan reacción de precipitación con los sobrenadantes homólogos a título de 1 por 64, título que es reducido a 1 por 16 después de digerir los sobrenadantes con tripsina.

Los mismos sueros fueron capaces de proteger pasivamente al ratón contra inoculaciones con cultivos homólogos virulentos, pero no contra cultivos de tipos heterólogos del Grupo A, lo que demuestra que la especificidad de tipo de esta protección es debida a la proteína M.

Juntamente con la proteína M se aísla de los sobrenadantes la substancia T. El suero de los conejos inmunizados con la fracción precipitada con sulfato de amonio a 2/3 de saturación, dio reacciones de aglutinación con cepas de estreptococos que poseen el antígeno T homólogo pero no el M, hasta título del 1 por 2.560. Por medio de pruebas de aglutinación cruzada con diferentes tipos de estreptococos de antígenos M y T conocidos se demostró la especificidad anti-T de esta aglutinación.

Siguiendo las técnicas de Lancefield y Dole (9) se encontró que los concentrados de los sobrenadantes son capaces de producir el fenómeno de inhibición específica de la aglutinación de tipo T. Se demostró por primera vez que el mismo fenómeno de inhibición específica puede ser inducido por la proteína M en relación con la aglutinación de tipo M.

En el Cuadro II se resumen las experiencias relativas a estos experimentos.

Como puede verse en el Cuadro III, la excreción de la proteína M en los sobrenadantes de medios de caldo con Neopeptona (Difco) no es una propiedad constante en todas las cepas.

Se estudiaron 11 cultivos pertenecientes a 8 tipos diferentes de estreptococos del Grupo A, encontrando que sólo 6 produjeron en los sobrenadantes cantidades comparativamente iguales de substancia M a las obtenidas de las células por la extracción ácida. De los filtrados de las 5 cepas restantes se aislaron sólo trazas o nada de M a pesar de poseer esta proteína en cantidad abundante en las células. Como se desprende de la virulencia para el ratón presentada por cada una de las 11 cepas, es interesante observar que sólo las cadenas avirulentas excretaron la proteína en el sobrenadante, en tanto que las virulentas la retuvieron en sus células. Parece que existe cierta relación entre la capacidad de una cepa dada para producir la substancia M en el sobrenadante de un caldo con peptona y su virulencia para el ratón. Posiblemente este fenómeno esté asociado con la proteinasa estreptocócica

estudiada por Elliott, de que hablamos anteriormente, la cual es capaz de digerir la proteína M "in vivo". Al mismo tiempo parece que la proteinasa es uno de los factores relacionados con la virulencia de los estreptococos para el ratón. No fue posible demostrar la presencia de la enzima en los filtrados usados; sin embargo, la posibilidad de que la proteinasa se encontrara en la forma del precursor inactivo de la enzima no fue excluida.

### CUADRO III

Reacciones de Precipitación de la Proteína "M" de los Sobrenadantes y de los Extractos celulares de Cultivos de Estreptococos del Grupo A. (700 c.c. de Caldo-Neopeptona)

TIPO	CEPA	Compos anti-génica	Virulencia para el ratón	Desarrollo: mgs. de Nitrógeno bacteria no por 100 c.c.	Volúmenes Finales en c.c.		Reacciones de Precipitación con Antisueros Homólogos Específicos de Tipo I											
					"M" del sobrenadante	"M" de las células	"M" del sobrenadante						"M" de las células					
							1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:1	1:16	1:32	1:64		
1	S118/94/3	M T	No	15.6	65.0	8.5	++	+	+	—	—	—	+++	+	—	—		
3	C203	M T I 3	Si	10.8	66.0	8.5	++	+	+	+	—	—		+++	++	++		
14	S23/94/2	M T	No	4.8	36.0	8.5	++	++	++	+	—	—	+++	—	—	—		
17	J17E/100/6	M T	No	14.8	51.0	8.5	+++	+++		++	++	+	+++	+++	+++	+++		
17	DZQ5/34/0	M _	Si	8.7	42.0	7.0	+		+	—	—		++		+			
17	IRSC171/R621/1	M ?	No	2.8	46.5	7.0	++		+	+	+	—		++		+		
19	J17D/46/0	M T	Si	14.4	60.0	8.5	—	—	—	—	—	—	+++	++	+	+		
26	J17F/38/1	M T	Si	13.7	70.0	8.5	+	+	—	—	—	—	+++	++	+	+		
30	Adams	M ?	No	11.5	45.0	8.5	+++	+++	+++	++	++	+	—	+++	+++	+++		
30	D24/42/0	M -	No	8.0	44.0	8.5	++	++	++	+	—	—	+++	+++	+++	+++		
36	C119/58/1	M ?	Si	5.4	68.0	8.5	+	+	—	—	—	—	+++	+++	+++	++		

Cuadro tomado de Olarte (10)

### CUADRO IV

Propiedades características de los antígenos "M" y "T"

Método de diferenciación	"M"	"T"
Extracción de las células	Por calentamiento y HCl a pH 2-3	Por digestión con pepsina o tripsina
Enzimas proteolíticas	Digerido rápidamente	Resiste la digestión
Composición química	Proteína, libre de ácido nucleico, alcohol soluble, peso molecular 41,000, del tipo de la zeína.	Proteína, libre de ácido nucleico, no es alcohol soluble.
Punto isoeléctrico	pH 4.5	pH 4.5
Calor	Termoestable	Termolábil

Estabilidad en cultivos	Varía según el grado de disociación de cada cultivo presente sólo en colonias "matt"	Constante y estable, presente en colonias "matt" y colonias "glossy"
Especificidad	Cada tipo de Lancefield posee su proteína "M" específica	Algunos antígenos "T" son comunes a 2 ó más tipos de Lancefield.
Reacción serológica dominante	Precipitación (Clasificación de Lancefield).	Aglutinación (Clasificación de Griffith).
Antigenicidad	Moderadamente antigénica en la célula. Poco antigénica en solución.	Altamente antigénica tanto en la célula intacta como en solución.
Protección	Sus anticuerpos confieren Protección tipo-específica activa y pasiva.	Sus anticuerpos no tienen ninguna acción protectora.
Relación con la virulencia	Es uno de los factores esenciales de la virulencia	Se encuentra tanto en los cultivos virulentos como en los avirulentos.

Cuadro tomado de Lancefield y Dole (9) y modificado por el autor.

Resultados semejantes a los expuestos en el Cuadro III se obtuvieron utilizando caldo con Proteosa-peptona (Difco). En cambio el medio de composición química definida de Bernheimer et al (1), el cual contiene hidrolizado de caseína, 10 de los 11 cultivos estudiados no excretaron la proteína M en el sobrenadante a pesar del hecho de que se obtuvo buen desarrollo y de que cantidades considerables de la proteína M pudieron ser extraídas de las células. Elliott y Dole (5) encontraron que la caseína inhibe la conversión autocatalítica del precursor inactivo en proteinasa activa.

Se pensó que la proteína M obtenida de los sobrenadantes se mostraría como un antígeno más potente que aquel extraído con ácido de las células. Aunque estas preparaciones de M son indudablemente antigénicas no hay evidencia de que la proteína M en esta forma o grado de pureza sea un antígeno superior a aquel preparado por Hirst y Lancefield (6) por medio de extracciones repetidas de los organismos con ácido clorhídrico N/20 a 37° C.

#### RESUMEN

En el Cuadro IV se hace un resumen comparativo de las propiedades características de las proteínas M y T.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BERNHEIMER, A. W. GILLMAN, W.. HOTTLE, G. A. and A. M. PAPPEN-HEIMER, Jr. 1942. An improved medium for the cultivation of *Hemolyticus streptococcus*. J. Bact., 43, 495.
2. BERNHEIMER, A. W. and A. M. PAPPENHEIMER; Jr. 1942. Factor necessary for massive growth of Group A *hemolytic streptococcus*. J. Bact., 43, 481.
3. BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. 6 th. ed. Williams & Wikkins Co., Baltimore, 1948, 312.
4. ELLIOT, S. D. 1945. A proteolytic enzyme produced by group A streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen. J. Exp. Med. 81, 573.
5. — and V. P. DOLE. 1947. An inactive precursor of streptococcal proteinase. J. Exp. Med., 85, 305.



6. — HIRST, G. K. and R. C. LANCEFIELD. 1939. Antigenic properties of the type specific substance derived from group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.*, 69, 425.
- 7.—JORDAN, E. O. and W. BURROWS, 1945. *Textbook of Bacteriology*. 14 Th. ed. W. B. Saunders Co., Philadelphia and London, pp. 317.
- 8.—LANCEFIELD, R. C. 1941. Specific relationship of cell composition to biological activity of hemolytic streptococci. *Harvey Lectures*, 36, 251.
- 9.— and V. P. DOLE. 1946. The properties of T antigens extracted from group A hemolytic streptococci. *J. Exp. Med.* 84, 449.
- 10.— OLARTE, J. 1948. Demonstration of the "M" protein in culture filtrates of hemolytic streptococci of group A. *J. Immunol.*, 58, 15.
11. —PAPPENHEIMER, A. M., Jr., Williams, J. W. and C. A. ZITTLE. 1942. The antigenic structure of hemolytic streptococci of Lancefield group A. IX. Some physical properties of the M-protein. *J. Immunol.*, 43, 61.
- 12.— SWIFT. H. F. WILSON, A. T. and R. C. LANCEFIELD. 1943. Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions in capillary pipettes. *J. Exp. Med.* 78. 127.
- 13.— TOPLEY, W. W. C. and G. S. WILSON. 1937. *The Principles of Bacteriology and Immunity*. 2<sup>nd</sup>. ed. William Wood and Co., Baltimore. pp. 469-472:
  - a) Andrewes, F. and T. Horder. 1906. *Lancet*, ii. 708, 775, 852.
  - b) Griffith. F. 1926. *J. Hyg., Cambridge, Eng.* 25, 358; *Ibid.*, 1927, 26, 363; *Ibid.*, 1928, 27, 113; *Ibid.*, 1934, 34, 542; *Ibid.*, 1935,35, 23.
  - c) Lancefield, R. C. 1928. *J. Exp. Med.* 47, 91, 468, 481, 857; *Ibid.*,
  - d) Marmorek, A. 1895. *Ann. Inst. Pasteur*, 9, 539.
  - e) Schottmüller, H 1903. *Münch., med. Wschr.*, 50, 849, 909.
- 14.— ZITTLE, C. A. 1942. The antigenic structure of hemolytic streptococci of Lancefield group A. VII. Separation of the protein and nucleic acid of the typespecific M substance and some chemical and serological properties of the purified type-specific protein. *J. Immunol.*, 43, 31. 1933, 57, 571; *Ibid.*, 1934, 59, 441.
- 15.— and F. B. SEIBERT. 1942. The antigenic structure of hemolytic streptococci of Lancefield group A. VIII. Electrophoretic studies of the type-specific M protein and other isolated fractions. *J. Immunol.*, 43, 47.