

Una modificación del líquido de broquet para la mejor conservación de la vitalidad y virulencia del Bacilo pestis en órganos pestosos(*)

Por ABEL S. ISSALY e INDA S. M. de ISSALY

El mantenimiento de la vitalidad del bacilo pestis, en órganos, culturas y productos patológicos, ha constituido siempre un problema, debido a la extrema sensibilidad de este germen.

Problema que se hace más evidente, en los casos de la aparición de brotes epidémicos, en lugares alejados de los centros de investigación, a los cuales se hace necesario el envío de materiales presuntamente pestosos, en las mejores condiciones posibles para el mantenimiento de la vitalidad y virulencia del bacilo, con fines de diagnóstico y estudio.

La acción de los agentes físicos influye desfavorablemente sobre este bacilo. Así, el calentamiento a 60° lo destruye en una hora y a 100° en un minuto.

Por la desecación pierde la virulencia en un término que va desde horas hasta 7 a 8 días.

Lo mismo sucede con la luz solar y la luminosidad, que lo destruyen en un tiempo variable.

Entre los agentes químicos que lo matan con rapidez se cuentan: el fenol al 1 % y la lechada de cal, que actúan rápidamente; el sublimado al 1 ‰ de acción instantánea; el ácido clorhídrico al 1 ‰ y el ácido sulfúrico al 0,5 ‰, en contados minutos.

En el pus y los esputos, sin embargo, conserva mayor tiempo su vitalidad, al igual que en el suelo húmedo, donde se ha encontrado al bacilo pestis después de muchos meses.

En cambio, la vitalidad sobre el cadáver u órganos está subordinada a la temperatura y al estado de putrefacción de los mismos. En los cadáveres putrefactos desaparece en días, y en los expuestos a bajas temperaturas, se conserva un mayor tiempo; así lo demuestran las experiencias de Zlatogoroff, quien afirma la existencia

(*)Este trabajo fué realizado en la Sección Peste del Instituto Bacteriológico "Malbrán".

Presentado en la reunión de comunicaciones del 7 de septiembre de 1948.

de este bacilo a los 109 días en cadáveres abandonados de ratas a 3 y 5°. En la epidemia de Moukden, en cadáveres expuestos a fríos muy intensos, se conservó la virulencia del germen hasta tres meses.

De acuerdo a estos antecedentes, Broquet ideó un líquido de conservación para efectuar el envío de materiales pestosos desde lugares lejanos, y que se ha adoptado en la Sección Peste del Instituto Bacteriológico "Malbrán", para el envío de bazos de ratas desde los puertos de Bahía Blanca, Quequén, Rosario, etc.

La inoculación subcutánea a caviás, del macerado de dichos bazos, que han permanecido hasta 8 días en el medio conservador, ha dado hasta la actualidad, contados casos de peste.

Ello nos hizo insistir en el estudio de la eficiencia del líquido de Broquet y de los factores que pueden alterarla, tomando como base el trabajo de los doctores Uriarte y Morales Villazón: "Conservación de la vitalidad y virulencia del Bacilo Pestis".

Para realizar nuestras experiencias, partimos de un líquido de Broquet preparado de acuerdo a su fórmula:

Glicerina pura y perfectamente neutra a 30° Beaumé	20 cc.
Carbonato de Calcio (precipitado liviano)	2 grs.
Agua destilada c. s. p.	100 cc.

La mezcla fué esterilizada 10 minutos a 110° y envasada en frascos también estériles.

Para todas las experiencias realizadas partimos siempre de una misma cepa de Bacilo Pestis, de reconocida virulencia, con la cual obtuvimos, para nuestras observaciones, el siguiente material:

- 1) Cultivo puro de Bacilo Pestis en caldo.
- 2) Bazos frescos de caviás pestosos.
- 3) Médulas óseas frescas de caviás pestosos.
- 4) Bazos de caviás pestosos, extraídos después de 24, 48 y 72 horas de muerto el animal y dejado a la temperatura ambiente.

1. CULTIVO PURO DE BACILO PESTIS EN CALDO

Realizamos esta experiencia con el objeto de ratificar que el líquido de Broquet no disminuye la vitalidad del Bacilo Pestis en culturas puras.

Mezclamos partes iguales de un cultivo puro de Bacilo Pestis en caldo y líquido de Broquet (10 cc. de cada una).

Al cabo de 24 horas de mantener esta mezcla a la temperatura de antecámara, fué inoculada subcutánea e intraperitonealmente a caviás, con intervalos de 10 días y en proporción de 1 cc. por vez.

La Tabla siguiente de la que deducimos los resultados de esta experiencia ha sido verificada, varias veces, lo mismo que todas las Tablas del presente trabajo.

Los resultados fueron:

TABLA I

DÍAS DE MEZCLA	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
1	26/11/47	29/11/47	Peste
10	6/12/47	9/12/47	Peste
20	16/12/47	20/12/47	Peste
30	26/12/47	29/12/47	Peste
40	5/ 1/48	10/ 1/48	Peste
50	15/ 1/48	21/ 1/48	Peste
60	25/ 1/48	30/ 1/48	Peste
70	4/ 2/48	8/ 2/48	Peste
80	14/ 2/48	21/ 2/48	Peste
90	24/ 2/48	29/ 2/48	Peste

Confrontada esta experiencia con las observaciones simultáneas realizadas con un cultivo de *B. Pestis* puro en caldo, como testigo, que mantuvo su virulencia 95 días, deducimos que el líquido de Broquet, no altera la virulencia del *B. de Yersin*.

2. BAZOS FRESCOS DE CAVIAS PESTOSOS

De acuerdo a la técnica precisada por los doctores Uriarte y Morales Villazón, en el trabajo ya citado, se inoculó una cepa de *Bac. Pestis* a varios caviás.

Inmediatamente después de la muerte, se extrajeron los bazos y se colocaron en número de dos por cada frasco con líquido de Broquet, preparado en el laboratorio, que se tomó como testigo.

Como problema se usó líquido de Broquet proveniente de los frascos enviados desde los puertos, en los que colocamos, también, bazos de caviás pestosos, en número de dos por cada frasco.

Dejados dichos frascos a la temperatura ambiente, a partir del quinto día se inoculó a caviás, el macerado de bazos, testigo y proble-

ma respectivamente, por la técnica común de trituración y con suero fisiológico.

Los resultados fueron:

TABLA II

DÍAS EN LÍQUIDO DE BROQUET	Material	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
5	T	25/11/47	29/11/47	Peste
	P		30/11/47	Peste
7	T	27/11/47	3/12/47	Peste
	P		29/11/47	Peste
9	T	29/11/47	2/12/47	Peste
	P		3/12/47	Peste
11	T	1/12/47	No muere	
	P		No muere	
12	T	2/12/47	No muere	
	P		No muere	

T = Testigo. P = Problema.

De la Tabla II se deduce que la pérdida de la virulencia se produce entre el noveno y décimo día de permanencia en líquido de Broquet para la cepa usada.

No hubo diferencia en el comportamiento de los líquidos problema y testigo, por lo que descartamos la posibilidad de mala preparación del líquido conservador en los lugares de envío.

3. MÉDULAS FRESCAS DE CAVIAS PESTOSOS

Los doctores Uriarte y Morales Villazón afirman en su trabajo que: "En la médula ósea de un animal infectado, la vida del germen es más prolongada que en el bazo, aunque haya estado abandonado al aire libre, en cuyas circunstancias pueden concurrir factores desfavorables a la conservación".

Comprueban que la siembra de médula ósea en agar y caldo da resultados positivos hasta el duodécimo día, con la cepa usada por ellos.

Basándonos en estos antecedentes, ensayamos reemplazar los bazos frescos de caviar pestosos por médulas óseas frescas de caviar pestosos.

Se inoculó siempre la misma cepa de Peste a un lote de caviás, e inmediatamente después de producida la muerte, separamos las tibias y las despojamos de las partes blandas. Luego se colocaron en líquido conservador.

A partir del sexto día, se inoculó procediendo así: Extraída la tibia del frasco, la lavamos en cápsula de Petri con solución fisiológica, seccionamos el hueso y esterilizamos la superficie del corte con una espátula de hierro al rojo. Colocamos en mortero estéril una cantidad mínima de solución fisiológica en la que humedecemos el ansa, la cual, introducida en la médula, se descargó luego repetidas veces en el mortero hasta que el canal medular quedó vacío. Trituramos e inoculamos. En las inoculaciones de los últimos días de permanencia de las médulas en el líquido de Broquet se hizo necesario ablandar el contenido del canal medular.

Los resultados fueron:

TABLA III

DÍAS EN EL LÍQUIDO DE BROQUET	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
6	14/1/48	18/1/48	Peste
9	17/1/48	24/1/48	Peste
12	20/1/48	26/1/48	Peste
15	23/1/48	1/2/48	Peste
16	24/1/48	2/2/48	Peste
18	26/1/48	No muere	
21	30/1/48	No muere	

Comprobamos que la conservación de la virulencia y vitalidad del Bacilo de Yersin se mantiene hasta los 16 días, vale decir, casi el doble de tiempo que en los bazos frescos de caviás pestosos.

Sería, entonces, más efectivo el envío de médulas y no de bazos, aunque en la práctica sea más engorroso.

4. BAZOS DE CAVIAS PESTOSOS EXTRAÍDOS DESPUÉS DE 24, 48 Y 72 HORAS DE MUERTO EL ANIMAL

Producida la muerte de tres caviás, previamente inoculados de Peste, se los dejó a la temperatura ambiente 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Luego, se extrajeron los bazos y se colocaron en líquido de Broquet, procediendo a inocular, como en los casos anteriores.

Los resultados fueron:

TABLA IV

Muerte del cavia pestoso	Tiempo abandonado	Tiempo en Líquido de Broquet	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
29/1/48	24 horas	2	1/2/48	5/2/48	Peste
		4	3/2/48	9/2/48	Peste
		6	5/2/48	10/2/48	Peste
		8	7/2/48	No muere	
		10	9/2/48	No muere	
19/1/48	48 horas	2	23/1/48	27/1/48	Peste
		4	25/1/48	29/1/48	Peste
		6	27/1/48	No muere	
		8	29/1/48	No muere	
19/1/48	72 horas	2	24/1/48	29/1/48	Peste
		4	26/1/48	No muere	
		6	28/1/48	No muere	

5. ALGUNOS FACTORES QUE ALTERAN LA EFICACIA DEL LÍQUIDO DE BROQUET

En la primera experiencia de bazos, observamos que a partir del octavo día se producían hongos sobre la superficie del líquido, que por gentileza del doctor Negróni fueron clasificados como pertenecientes al Género *Penicillum*.

Siendo estos hongos un factor de alteración de la eficacia del líquido de Broquet, para evitarlos, en las experiencias subsiguientes esterilizamos los corchos a seco y los sumergimos en un baño de parafina caliente, ya que suponíamos que los hongos provenían de los corchos. Así resguardados éstos, y una vez llenos los frascos con el líquido, parafinamos nuevamente el cierre por fuera.

No se volvieron a producir hongos en las experiencias sucesivas, a pesar de que en las últimas experiencias, mantuvimos frascos con líquido de Broquet y con órganos, hasta 28 días.

El pH del líquido de Broquet recién preparado es de 9,15 controlado por Potenciómetro Gamma. Al noveno día de mantenimiento de los bazos, el pH baja a 6. Creímos que el descenso de pH sería, a su vez, una de las causas primordiales de la pérdida de

la virulencia, dado que el pH óptimo para el mejor mantenimiento de la vitalidad y virulencia del B. de Yersin, varía entre 6,3 y 7.

Para evitar dicha acidificación recurrimos a una:

MODIFICACIÓN DEL LÍQUIDO DE BROQUET

que consistió en el agregado de una solución "Buffer o Tampón".

Entre las conocidas nos pareció la más conveniente la solución Tampón de McIlvaine, compuesta por:

X cc. dilución 0,2 molar de Fosfato ácido Bisódico

X cc. solución 0,1 molar de Ácido Cítrico.

De la cual, según las tablas, necesitaríamos 19,45 cc. de la primera y 0,55 cc. de la segunda, para obtener un pH de 8. En base a lo anterior, modificamos la fórmula de Broquet así:

Glicerina pura y perfectamente neutra a 30°	
Beaumé	20 cc.
Carbonato de calcio (precipitado liviano)	2 grs.
Solución Buffer de pH 8	40 cc.
Agua destilada c. s. p.	100 cc.

O lo que es igual, para abreviar la preparación y usando las equivalencias en gramos de la solución Buffer:

Glicerina pura y perfectamente neutra a 30°	
Beaumé	20 cc.
Carbonato de Calcio (precipitado liviano)	2 grs.
Fosfato ácido bisódico	1,1046 grs.
Ácido cítrico	0,0230 grs.
Agua destilada c. s. p.	100 cc.

EFICACIA DEL LÍQUIDO DE BROQUET MODIFICADO

1. En bazos frescos de caviar pestosos

Preparados los frascos con las precauciones anteriormente anotadas y con esta modificación del líquido, colocamos en ellos bazos pestosos de un lote de caviar, muertos por inoculación experimental.

El pH inicial del líquido fué de 8,3.

Iniciadas las inoculaciones a partir de los 9 días de permanencia en el líquido de Broquet, los resultados fueron:

TABLA V

DÍAS EN EL LÍQUIDO DE BROQUET	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
9	3/2/48	8/2/48	Peste
15	9/2/48	12/2/48	Peste
20	14/2/48	18/2/48	Peste
22	16/2/48	20/2/48	Peste
24	18/2/48	25/2/48	Peste
26	20/2/48	No muere	

Confirmamos que los bazos pestosos han conservado su virulencia durante un tiempo superior al doble que en el líquido de Broquet común.

El pH Final fué de 7,2, adecuado al mantenimiento de la vitalidad y virulencia del B. Pestoso.

2. En médulas óseas frescas de caviar pestosos

La técnica usada fué la misma que la descripta anteriormente y las inoculaciones se hicieron a partir del noveno día, con el resultado siguiente:

TABLA VI

DÍAS EN EL LÍQUIDO DE BROQUET	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
9	3/2/48	8/2/48	Peste
15	9/2/48	13/2/48	Peste
20	14/2/48	19/2/48	Peste
25	19/2/48	24/2/48	Peste
28	22/2/48	29/2/48	Peste
30	24/2/48	No muere	

Es decir que, en médula ósea mantenida en líquido de Broquet modificado, la virulencia del B. de Yersin llega a 28 días, mientras que en líquido de Broquet original, se perdía a los 16 días.

3. *Bazos de caviás pestosos, extraídos después de 24, 48 y 72 horas de muerto el animal*

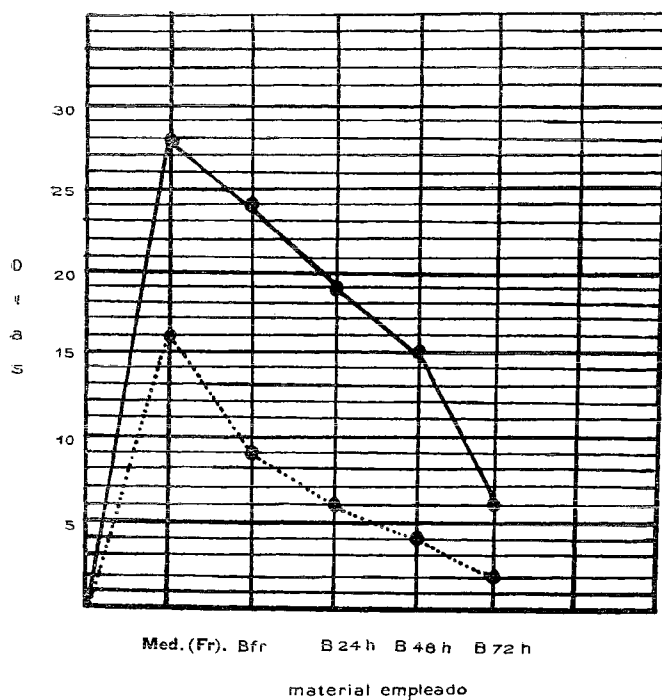
Procedimos como en el caso correspondiente con Broquet original, y los resultados fueron:

TABLA VII

Muerte del cavia pestoso	Tiempo abandonado	Tiempo en Líquido de Broquet	Inoculación	Muerte	Diagnóstico
21/2/48	24 horas	4	26/2/48	29/2/48	Peste
		8	1/3/48	4/3/48	Peste
		12	5/3/48	9/3/48	Peste
		15	8/3/48	13/3/48	Peste
		18	11/3/48	17/3/48	Peste
		20	13/3/48	No muere	
21/2/48	48 horas	4	27/2/48	2/3/48	Peste
		8	2/3/48	6/3/48	Peste
		12	6/3/48	11/3/48	Peste
		15	9/3/48	15/3/48	Peste
		18	12/3/48	No muere	
21/2/48	72 horas	2	26/2/48	3/3/48	Peste
		4	28/2/48	6/3/48	Peste
		6	1/3/48	8/3/48	Peste
		8	3/3/48	No muere	

En relación a la experiencia anterior, la vitalidad y virulencia del B. de Yersin en el líquido de Broquet modificado, ha aumentado 12 días para los bazos de caviás pestosos muertos, que han sido dejados 24 horas a la temperatura ambiente: 11 días para los bazos de caviás pestosos dejados 48 hs. a la temperatura ambiente, y 4 días para los bazos de caviás pestosos dejados 72 horas a la temperatura ambiente.

Para mayor claridad podemos sintetizar los resultados en un sistema de coordenadas en las cuales la abscisa corresponde a los Días y la ordenada al material empleado.



..... En líquido de Broquet sin modificar.

— En líquido de Broquet modificado.

Dejamos constancia que todos los diagnósticos de peste han sido hechos en base a: 1) Las lesiones típicas producidas por el Bacilo de Yersin en los caviás muertos. 2) La observación directa de frotis coloreados de bazo y líquido peritoneal de los caviás muertos. 3) Las colonias obtenidas por siembra del contenido medular de los caviás muertos en agar estría y en caldo.

Además, todas las experiencias fueron realizadas durante los meses de verano, descartando así la posibilidad de que, una más baja temperatura ambiente, pudiera haber influido en los resultados finales.

RESUMEN

- 1) Se confirma que el líquido de Broquet es un buen conservador y mantiene la vitalidad y virulencia del B. de Yersin en órganos pestosos frescos en intervalos que varían entre 9 y 15 días.

- 2) Es más conveniente el envío de médulas, que de bazos, desde lugares alejados, por mantenerse en las mismas más tiempo la virulencia del germen, pero en la práctica su empleo es más engorroso.
- 3) La formación de hongos en la superficie del líquido y la acidificación del medio por la putrefacción de los tejidos, son los principales factores que alteran la eficacia del líquido de Broquet.
- 4) Para evitar los hongos, proponemos la esterilización seca de los corchos y el parafinado posterior del corcho y del cierre, por fuera.
- 5) Para disminuir la acidificación del medio, proponemos la modificación del líquido de Broquet por el agregado del Buffer, de manera que la fórmula final sería:

Glicerina pura y perfectamente neutra a 30°

Beaumé	20 cc.
Carbonato de Calcio (precipitado liviano)....	2 grs.
Fosfato ácido bisódico	1,104 grs.
Ácido cítrico	0,023 grs.
Agua destilada c. s. p.	100 cc.

- 6) En dicho medio aumenta considerablemente el tiempo de conservación de la vitalidad y virulencia del B. de Yersin, tanto en los órganos frescos como en los órganos con comienzo de putrefacción.

Agradecemos las facilidades y la confianza que nos dispensó el doctor Benjamín Anchezar, Jefe de la Sección Peste del Instituto Bacteriológico "Malbrán", para realizar este trabajo, así como las sugerencias y consejos de los doctores Renella, Morales Villazón e Illa, y la atención de todo el personal de la Sección.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) URIARTE, L., y MORALES VILLAZÓN, N.: Conserv. de la vitalidad y virulencia del Bacilo Pestis, *Rev. Inst. Bact. "Malbrán"*, Vol. VIII, Nov. 1936.
- (2) URIARTE, L., MORALES VILLAZÓN, N., y ANCHEZAR, B.: Un procedimiento para la investigación de la Peste en los roedores, *Rev. Inst. Bact.*, Vol. VII, Jul. 1935.
- (3) TOPLEY y WILSON: *Pesteurella*, Cap. XXIX, Edic. 1942.
- (4) *Farmacopea Nacional Argentina*. Tercera edición, pág. 753.
- (5) BROUARDEL, GILBERT, CARNOT: *Nouveau Traité de Médecine*. Maladies exotiques. Tomo VI, pág. 169.