

la tropa fué vacunada (vac. I, II, III). La alteración de los resultados provocada por esta medida profiláctica podrá apreciarse en la Tabla II, donde para mayor claridad hemos distribuido los casos en dos grupos, vacunados y no vacunados, indicando al mismo tiempo el mes en que se produjo la enfermedad.

No obstante indicar estos datos un evidente efecto durante los seis meses siguientes a la vacunación, sobre todo en las afecciones debidas a neumococos tipos I y II, creemos oportuno no ser concluyentes al respecto y esperamos el momento de tener una mayor experiencia para emitir opinión acerca de la acción ejercida por la vacuna antineumocócica en el medio militar.

La infección experimental determinada por la Cepa EV. de Girard (= *Pausterella pestis*, avirulenta). - Su estudio bacteriológico y anatomo-patológico ¹

Por B. ANCHEZAR ²

Las investigaciones que a continuación se relatan no son, en realidad, más que una parte de los estudios preliminares que se efectúan en la Sección Peste del I. Bacteriológico, para poder encarar, sobre bases sólidas y seguras, la elaboración de una vacuna antipestosa con bacterias vivas de cepas avirulentas [GIRARD emplea la cepa EV, aislada de un pestoso (1926) en Madagascar y espontáneamente atenuada *in vitro*; OTTEN, a su vez, usa en Java una cepa atenuada de origen murino], con la cual ensayar ulteriormente, también en nuestro país, la vacunación del hombre contra la peste por este procedimiento reciente, que tan brillantes y benéficos resultados han rendido entre la población de Madagascar. Por tanto, y de modo más concreto, puede decirse que el propósito del presente trabajo ha sido, una vez contrastada la perduración de sus caracteres bacteriológicos específicos, verificar mediante un estudio experimental si las muestras de la cepa EV. de GIRARD, gentilmente cedidas al Instituto Bacteriológico, seguían manteniendo intacta la más sobresaliente de sus características: la avirulencia.

I. MATERIAL ORIGINARIO. - VERIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA Y CONSERVACIÓN DE LA CEPA EV

MATERIAL ORIGINARIO. — 2 tubos de agar inclinado, con desarrollo de cepa EV., cerrados a la llama; que fueron enviados por el Instituto Pasteur de París.

VERIFICACIÓN BACTERIOLÓGICA. — *Caracteres morfológicos.* — En los preparados de cultivos de algunos días de edad, se trata de un cocobacilo, con ex-

¹ Este artículo es un extracto de la parte de la tesis del doctorado en medicina del mismo autor, que fué publicada en *Revista del Instituto Bacteriológico del D. N. H.*, 8, (2), 196-227, Agosto 1938.

² El A. agradece al Prof. Dr. A. SORBELLI, la elección del tema, el plan de trabajo y la asistencia dispensada durante el desarrollo de la labor experimental.

AVISO AL LECTOR

Desde 1939, FOLIA BIOLOGICA, aparecerá como « publicación de la Revista del Instituto Bacteriológico ».

tremos redondeados y centro claro, inmóvil, sin esporas. Gram negativo. En los medios líquidos forma cadenas.

Caracteres de los cultivos. — *Temperatura óptima:* 20°V. *Agar estría:* colonias aisladas o confluentes, lisas y rugosas. *Caldo peptonado:* copos sueltos, frágiles, primero en el fondo y luego en la superficie del medio, que no se enturbia. *Formación de gas:* nula. *Medio de Uriarte y Morales Villazón:* pequeñísimos copos que no enturbian el medio nutritivo, virado al rojo solferino, sin producción de gas. *Medio de Bezsanova:* el desarrollo bacteriano no produce el viraje de la coloración propia del medio.

CONSERVACIÓN DE LA CEPA EV. — Los primeros trasplantes del material originario, en agar inclinado y en caldo peptonado (pH 7.4 — 7.6) dieron, a 18° - 24°C, un desarrollo algo tardío. Luego, en las resiembras sucesivas ya se obtuvo desarrollo abundante a las 48 horas. La conservación de la cepa se logra: a) por trasplantes en agar estría, y b) mediante desecación en alto vacía fosfórico.

II. ESTUDIO EXPERIMENTAL

La infección experimental de diversos animales de laboratorio, mediante la inyección de suspensiones de bacterias EV. en diferentes concentraciones, según se detallará más adelante, permitió: A) Estudiar la marcha del proceso infectante y permanencia de la infección en condiciones experimentales diversas, por medio del examen bacterioscópico y cultivo de vísceras, sangre y formaciones patológicas. B) Verificar la persistencia de la avirulencia de la bacteria EV. C) Apreciar su poder tóxico. D) Observar las alteraciones anatómicas y las lesiones histopatológicas producidas en el organismo de los animales inoculados

A. *Estudio de la marcha del proceso infectante y de la permanencia de la infección.* — La investigación se realizó mediante el examen bacterioscópico (preparados, teñidos con azul de metileno y con Gram Kopeloff, de bazo, ganglios linfáticos y del absceso en el punto de inoculación o del exudado peritoneal) y cultivos en agar estría y caldo (siembras de bazo, ganglios linfáticos, sangre cardíaca, medula ósea de tibia, y exudado peritoneal o absceso en el punto de inoculación).

Se inocularon caviás, conejos, ratones blancos y ratas blancas. Como los caviás se demostraron más sensibles que los otros y los resultados obtenidos fueron más regulares, aquí solo se detallarán las investigaciones efectuadas en los primeros.

Las series inyectadas fueron 10 y con los animales sobrevivientes se constituyó otra (11ª). De éstas en 5 se empleó 1 cm³ de suspensión de 2.000 millones de bacterias EV. por cm³, introducidas por vías subcutánea, intraperitoneal, traqueal, percutánea, digestiva; en 1 se empleó 1 cm³ de suspensión de 5.000 millones por cm³, por vías subcutánea, intraperitoneal y traqueal; en 1 se empleó 1 cm³ de suspensión de 10.000 millones por cm³; en 2 se emplearon 5 cm³ de una suspensión de 10.000 millones por cm³ y en 1 se empleó suspensiones de 45.000 y 50.000 millones por cm³.

En los animales inoculados con 2.000 millones, sacrificados en diferentes momentos, pero siempre después de las 24 horas, no se comprobó la existencia de bacterias EV.

En los animales inoculados con 5.000 millones, sacrificados día por día, tampoco se hallaron bacterias EV; pero 2 caviats inyectados por vía intraperitoneal murieron antes de ser sacrificados.

En los animales inoculados con 1 cm³ de 10.000 millones, la existencia de bacterias EV. solo pudo comprobarse por cultivo en los animales inyectados por vía peritoneal y sacrificados antes de las 24 horas.

En los animales inoculados con 5 cm³ de 10.000 millones por vía subcutánea, sacrificados en distintos momentos, la existencia de bacterias EV. pudo ser comprobada por bacterioscopia: en ganglio inguinal — desde las 2 horas hasta las 4 horas siguientes a la inyección; en bazo — solo en un animal sacrificado a las 16 horas; y en el absceso en el punto de inoculación — desde las 16 horas hasta el 6 día. En cambio por cultivo, la bacteria EV. fué aislada de ganglio inguinal — desde las 2 horas hasta los 2 días —; de sangre de corazón — solo a las 2 horas —; de bazo — desde las 2 horas hasta los 2 días —; de medula ósea — 16 y 24 horas —; y del absceso en el punto de inoculación — desde las 16 horas hasta los 15 días.

En los animales inoculados con 5 cm³ de 10.000 millones por vía peritoneal, la existencia de bacterias EV. fué comprobada por bacterioscopia: en ganglio inguinal — desde las 2 horas hasta las 18 horas —; en bazo — desde las 2 horas hasta las 16 horas —; y en el exudado peritoneal — desde las 2 horas hasta las 24 horas —. Y por el cultivo, de ganglio inguinal — desde las 2 horas hasta los 2 días —; de sangre del corazón — sólo a las 2 horas —; de medula ósea — desde las 6 horas hasta los 2 días —; de bazo — desde las 2 horas hasta los 2 días —; y de exudado peritoneal — desde las 2 horas hasta los 6 días.

Los caviats de estas diez series que no fueron sacrificados, sobrevivieron todos (a excepción de un 20 % de los inyectados por vía peritoneal con 1 cm³ de 5.000 millones; un 25 % de aquellos inyectados por la misma vía con 10.000 millones; y la gran mayoría de los inyectados con 5 cm³ de 45.000 y 50.000 millones — estos dos últimos a las 48 horas por vía peritoneal y a los 5 días por vía subcutánea). En los animales sobrevivientes, sacrificados a los 30-45 días, no pudo revelarse la existencia de bacterias EV.

B. *Persistencia de la virulencia de la bacteria EV.* — Para determinarla se recurrió al repetido pasaje de la cepa EV. por el organismo de una misma especie animal. La técnica empleada fué la siguiente: Una serie de caviats fué inoculada con una suspensión de 10.000 millones, por cm³, de bacterias EV.; recibiendo cada animal 5 cm³ por vía subcutánea. Estos animales eran sacrificados a las 24 horas y con material de bazo y ganglio linfático se efectuaban siembras separadas en tubos de agar estría. El desarrollo obtenido era resembrado, también separadamente, para obtener una cantidad de cultivo suficiente a fin de hacer suspensiones de 10.000 millones de bacterias por cm³. Estas suspensiones volvían a inocularse a otra serie de caviats. La misma operación se repitió cuatro veces consecutivas, dejando cada vez animales sin sacrificar.

El estudio de estos animales sobrevivientes demostró que la cepa EV. permanece avirulenta después de 5 pasajes por el organismo del cavia.

C. *Apreciación del poder tóxico.* — Para ello se comparó la acción letal de la cepa EV., viva y muerta por el calor.

La experimentación se condujo del modo siguiente: Una suspensión de 50 mil millones de bacterias EV., por cm³, muertas por calentamiento a 58° C.; durante 30 minutos en baño de María; se inoculó por vía peritoneal y subcutánea a 2 lotes de 4 caviás cada uno. Paralelamente, con otra suspensión de igual concentración de bacterias EV. vivas, se inocularon otros 2 lotes de 4 animales cada uno, por las mismas vías. Cada uno de estos 16 caviás fué inyectado con 5 cm³ de las respectivas suspensiones bacterianas. La muerte de las bacterias EV. por el calor era fiscalizada por medio del cultivo en agar y caldo.

De los caviás inoculados con bacterias muertas por vía peritoneal, 3 murieron a las 24 horas y el restante a las 48 horas; mientras que de los inoculados por vía subcutánea, 1 murió a las 72 horas, 2 a las 120 horas y otro sobrevivió. En cambio de los caviás inoculados con bacterias vivas por vía peritoneal, 2 murieron a las 48 horas, 1 a las 72 horas y otro sobrevivió; mientras que del lote inoculado por vía subcutánea 2 murieron recién al 5º día y otros 2 sobrevivieron.

La investigación bacteriológica efectuada en los animales muertos por la inyección de bacterias EV. muertas por el calor, fué negativa. El cultivo de los órganos de los caviás muertos por inoculación de bacterias EV., vivas, permitió recuperar este microorganismo.

D. *Alteraciones anatómicas y lesiones histopatológicas experimentales.* — Fueron observadas y estudiadas en todos los animales, principalmente caviás, utilizados en los diferentes experimentos realizados. El doctor Aníbal Itoiz, Jefe del Laboratorio del Instituto de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, realizó gentilmente el estudio microscópico.

En lo que se refiere a los caviás puede decirse que la inoculación de 2.000 millones de bacterias EV., por cm³, siguiendo las vías subcutánea, intraperitoneal, traqueal, percutánea y digestiva, no determina alteración patológica ninguna.

La inyección de dosis mayores de bacterias EV., produce lesiones inflamatorias localizadas (absceso en el punto de inoculación y adenitis del ganglio satélite; peritonitis) y lesiones generalizadas y efímeras del tipo congestivo en los demás órganos examinados.

III. CONCLUSIONES

1º - La cepa EV. de GIRARD aislada de un enfermo de peste ganglionar, corresponde por todos los caracteres bacteriológicos estudiados, a *P. pestis*.

2º - La cepa EV., es avirulenta para los animales de laboratorio.

3º - La inoculación de grandes dosis de bacterias EV., produce la muerte de los animales de laboratorio por intoxicación.

4º - La marcha de la infección experimental demuestra que las bacterias EV., tienen: a) un marcado tropismo por los ganglios linfáticos y el bazo; b) una fugaz permanencia en la sangre y en la medula ósea, y c) una mayor persistencia en las lesiones producidas en el sitio de inoculación.