ANALES DEL DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Mayo y Junio de 1915 Volumen XXII.—Número 3

INFORME DE LA COMISION

designada por el Ministerio de Agricultura para estudiar la eficacia

DEL COCO-BACILO ACRIDIORUM

D'Herelle como medio para la destrucción de la langosta

Profesor Dr. R. Kraus, Dr. F. Lahille, Dr. C. Maggio y Dr. D. Morales

CAPITULO I

Historia: El microorganismo denominado cocobacilo acridiorum D'Herelle, fué encontrado en México, estado de Yucután, por M. Félix D'Herelle, en el año 1909. D'Herelle tuvo ocasión de ver grandes invasiones de langosta *Schistocerca peregrina* 10 v., durante su permanencia en aquella República donde observó que una parte de esos insectos morían sin causa aparente. Por un exámen más atento vió que todos los cadáveres presentaban una diarrea negra; sembrado el producto excremeticial en agar dió el desarrollo de un cultivo casi puro del cocobacilo que llevaba su nombre. —Estas primeras observaciones fueron comunicadas a la Academia de Ciencias de París, (1) y dice: "qu'il serait peut-etee interessant de esseyer de provoquer des epizooties dans les pays que soufrent des depradations des Sauterelles en utilizant le cocobacille de l'épizootie de Yucutan".

La descripción de cocobacilo

En esos trabajos, M. D'Herelle ha descrito el cocobacilo acridiorum con los caracteres siguientes: un bacilo corto, ligeramen-

(1) F. D'Herelle. Sur une epizzotie de nature bacterienne sovissant sur les Sauterelles en Mexique. Comptes Reudus de l' Academie dex Sciencies. No 21 del 22 de Mayo de 1911.

te ovoide, muy polimorfo; en un mismo cultivo, se encuentran formas de cocos 0.6m. y al lado formas completamente bacilares 0.9 a 1.5 micras. Muy móvil, pues tiene pestañas en toda la periferia; no toma el Gram y se colorea facilmente por los colores de anilina.

En un cultivo joven y en el intestino de la langosta no se encuentran sino formas netamente cocobacilares, el microbio se colorea muy fuertemente en los polos, sobre todo con Ziehl puro durante uno o dos segundos.

Anacrobio facultativo.—Da cultivos entre 16° a 43° en todos los medios usuales, aun en el líquido de Raulin; a 37° en caldo, el enturbamiento es visible desde la cuarta hora.— Despues de algunos días se forma un ligero velo sin aclaramiento del caldo, el que no se produce sino despues de algunas semanas, con depósito barroso; un cultivo jóven, agitado produce ondas sedosas.— El olor de los cultivos recuerda al del caldo Liebig concentrado.

En agar las colonias jóvenes son circulares y tienen un aspecto ceroso. Las colonias son bien visibles despues de doce horas, despues de diez y ocho horas, tienen 2 a 3 milímetros de diámetro. En profundidad, se ven pequeñas colonias esféricas, blanquecinas, opacas.

No licua la gelatina. Coagula la leche, volviéndola fuertemente alcalina.

Da un cultivo muy abundante de aspecto cremoso, en papas.

El cocobacilo se desarrolla en caldo alcalino (2 gramos de soda por litro), él vegeta débilmente en los caldos ácidos. En los viejos cultivos se encuentra una alcalinidad tal que es necesario emplear 2 gramos de ácido sulfúrico para neutralizarla. Esta alcalidad es debida al amoníaco; el desprendimiento de éste es bastante grande y vira el papel de tornasol.

Fermenta la glucosa, levulosa, maltosa, galactosa. En los medios que contienen estos azúcares la reacción se torna muy pronto ligeramente ácida, poco tiempo después se vuelve alcalina.

Hablando de vitalidad y virulencia, dice M D'Herelle, que su vitalidad es considerable, aunque su virulencia disminuye muy rápidamente; es indispensable si no se quiere fracasar emplear un microbio que tenga gran virulencia, por eso es necesario emplear siempre un cultivo de virulencia exaltada. Con un cultivo de poca virulencia se corre el riesgo de inmunizar la langosta en vez de matarla.

La exaltación de la virulencia es sumamente sencilla, consiste en pasajes por langostas.—Empieza por agregar 1 ó 2 centímetros cúbicos de agua estéril en un tubo de agar que contenga el cultivo de cocobacilo emulsionado éste, se inyecta a la primera serie de langostas.—Las series siguientes se inyectan con excrementos de los que mueren, o que están agonizando diluídos en agua estéril o en caldo

M. D'Herelle hace tantos pasajes como sean necesarios para obtener un microbio que mate en pocas horas. Este producto excrementicial lo diluye al décimo y lo inyecta, una segunda série, con la segunda la tercera y así sucesivamente.

El autor considera que la virulencia del cocobacilo es suficientemente exaltada, cuando la muerte sobreviene, ocho horas después de la inyección.

M. D'Herelle considera que un virus al máximo de virulencia inyectado a una langosta a la dósis de un centésimo de centímetro cúbico produce la diarrea característica en dos horas y la muerte una hora más tarde; pero esta virulencia se obtiene sólo cuando se aisla el microbio del intestino de la langosta muerta en el campo, algunos días después de la infección de una manga.

El autor sostiene que rara vez es necesario hacer más de 12 pasajes para obtener buenos resultados en la práctica. En algunos casos le han bastado, seis pasajes para obtener una virulenccia satisfactoria

CAPITULO II

Experiencias personales del Dr. D'Herelle en la República Argentina

Desde el primer momento se pensó en aprovechar el descubrimiento de D(Herelle, como medio de destrucción para el acridio y el Gobierno de la Nación, lo contrató, para que personalmente hiciera los ensayos en este país; pues sabemos que la langosta constituye la más grande de las plagas, es el azote de extensas zonas agrícolas que pone en peligro las cuantiosas riquezas que ellas representan.

Una vez que M. D'Herelle estuvo en Buenos Aires inició sus primeros ensayos en la Provincia de Santa Fé cuyos resultados fueron relmente sorprendentes, pues dice haber obtenido un éxito completo (2) El 16 de Enero de 1912, hace su primera aplicación en una manga de saltona que se encontraba próxima al último pelecho ó muda, el 22 del mismo mes encontró mangas muertas a una distancia de 32 kilómetros.— La enfermedad se difundió con una pasmosa rapidez; el dia 29 se encontraron langostas enfermas con diarrea en la Provincia de Córdoba, a una distancia de 300 kilómetros del sitio donde se hizo la primera infección.— En todos los casos de los cadáveres el autor ha aislado el cocobacilo específico (3) y (4) ha hecho un ámplio estudio del cocobacilo acridiorum y ha dado su opi-

---

(2) F. D'Herelle. Sur la propagation, dans la Republique Argentine de l' epizootie des Sauterelles du Mexique. Comptes Rendus de l' Academie des Sciencies. Nº 9 Febrero de 1912. Pag. 848.

(3) F. D'Herelle. Cocobacilo acridiorum su aplicación a la destrucción de la langosta. Informe del 1º de Mayo de 1912. Ministerio de Agricultura. (R. A.).

(4) F. D'Herelle. Le cocobacille des Sauterelles. Annales de l' Institute Pasteur. 1914. Nº 3. Pag. 280 y Nº. 4, Pag. 387.

nión como medio de lucha contra el acridio.

El autor cita experiencias llevadas a cabo en langosta saltona, en Chamical (La Rioja) lugar que se encuentra muy invadido y dice que no obstante las malas condiciones en que se realizan los trabajos la epizootía gana a todas y puede decirse que prácticamente ningún insecto llega a estado adulto.

En el año 1913 la invasión se reduce a tres regiones—Rafaela, Río IV y Reconquista en Santa Fé en los tres lugares mencionados M. D'Herelle, hace pulverizaciones y dice "que prácticamente ninguna langosta llega al estado adulto."

CAPITULO III

Experiencias con cocobacilos por otros autores

Los gobiernos de otros países agrícolas se mostraron no menos interesados que éste en la cuestión del cocobacilo D'Herelle y designó dos comisiones para que se encargasen de este estudio. (5)

La primera comisión bajo la direción del Doctor Zea Uribe, Después de 30 pasajes según el método D'Herelle se resolvió a aislar el cocobacilo en agar.

Con este cocobacilo siembran tres litros de caldo y el 10 de Abril hace una pulverización a las seis de la tarde. El 12 de Abril, encuentran numerosos ejemplares muertos y otros enfermos. El 11 de Abril por la tarde pulveriza una segunda manga y el 15 la epizootía se ha desarrollado. Esta comisión colombiana adopta las conclusiones siguientes:

1.° El cocobacilo D'Herelle es un microbio patógeno para la langosta; convenientemente exaltado, determina en las mangas una epizootía que se propaga y termina con la destrucción de las mangas.

2.° El procedimiento de D'Herelle da muy buenos resultados y puede substituir con ventaja los usados actualmente para la lucha contra la langosta, sobre todo en píses como Colombia, donde la población es poco densa y repartida en un territorio muy extendido.

La segunda comisión que dirige el Doctor Lleras, procede también siguiendo las indicaciones de D'Herelle hasta obtener un microbio virulento.

El 1.° de Abril hacen la primera pulverización, el 5 del mismo mes encuentran numerosas langostas muertas, hasta un kilómetro de distancia del punto de la infección.

Concluyen que: "el cocobacilo D'Herelle, tiene un considerable "poder patógeno, para la langosta."

"La pulverización con cultivos, desarrolla la epizootía del coco-"bacilo en las mangas de langosta las que son destruídas en un tiem-"po relativamente corto."

(5) Luis Zea Uribe. Suplemento No. 1. Revista del Ministerio de Obras Públicas,

"El estado actual de nuestros experimentos, no nos permite "apreciar la intensidad y extensión del contagio".

Termina aconsejando al Gobierno a adoptar el procedimiento de D'Herelle para luchar contra la langosta.

No menos interesado se mostró el Gobierno de Sud Africa que comisionó a M. By Chas P. Lounibury, para que ensayaran el cocobacilo en la destrucción de una langosta especial de Sud Africa, *Zenurus elegans* (6).

El experimentador inglés hace numerosos pasajes, en una primera serie de experimentos llega a 30 pasajes, sin conseguir la virulencia indicada por por M. D'Herelle y que es indispensable para no fracasar. En una segunda serrie de experimentos después de 45 pasajes, consigue un microbio virulento. Con este microbio hizo sus aplicaciones en la campaña y según el experimentador sólo murieron aquellos insectos que tocó el líquido; no observó que la enfermedad se contagiase. (7).

En ausencia de M. D'Herelle, que se encontraba en viaje a Europa, la Dirección General de Agricultura y Defensa Agrícola, encargó al personal de la Sección Bacteriología del Instituto Entomológico, para que aplicase el cocobacilo D'Herelle para la destrucción de la langosta, llegando estos a la conclusión de que este medio no daba ningún resultado.

En Argelia Sergent y Lheritier (8), han experimentado en el Stauronotes marroquinus (Thumber), especie diferente de la Schysticerca paranensis; sus conclusiones son poco terminantes, dan esperanzas de que este medio pueda aplicarse más tarde en la práctica, cuando se aclare algunos puntos que permanecen aún obscuros.

Merechowsky (9) estudiando el bacilo D'Herelle ha solicitado cultivos al Instituto Pasteur de París, al de Argelia con que han trabajo Sargent y Lheritier y a la Argentina, estos tres cultivos del mismo bacilo, el autor, los encuentra diferentes.

Después de algunos pasajes, según el método aconsejado por D'Herelle, para reforzar la virulencia, aun cuando la inoculación haya sido hecha en la sangre y nó, en el intestino, dice el autor no se está jamás seguro de encontrar el mismo bacilo y así explica que los cultivos de bacilos D'Herelle sean diferentes.

En presencia de la multiplicidad de cultivos que llevan el nom-

---

Bogotá, año VII, No, 5, Mayo de 1913.

(6) P. Lunsbury. Locust Bacterial Disease, Agricultura Journal of the Union of South Africa, Abril 1913.

(7) D. Morales. Informe sobre el Cocobacilo Acridiorum D'Hsrelle, Buenos Aires Septiembre de 1913.

(8) Sergent et Lheritier. Essai de destrucción des Sauterelles en Algerie par le Cocobacille Acridiorum D'Herelle. Annales de l'Institute Pasteur, No. 4, Abril de 1914.

(9) S. S. Mercchkovsky. Zur Frage der Vertilgung der M. Wunderheuschrecken durch Kulturen des Bacillus D'Herelle. Centralb, für Bakt. Ilt. XI No. 1-8, 16 de Febrero de 1914.

bre de D'Herelle y que se encuentran en circulación, el autor piensa que hay que renunciar al emplo de este procedimiento para combatir la langosta mientras no se haya establecido préviamente por un estudio bacteriológico que se trata del bacilo D'Herelle.

CAPITULO IV

Comisión del cocobacilo D'Herelle.—Tipos de coco-bacilos que le han sido provistos.—Morfología y caracteres culturales.—Aglutinación.—Desviacion del complemento.

Su Excelencia el Señor Ministro de Agricultura, con fecha 21 Enero 1914 designó una comisión compuesta de los Señores: Profesor Dr. Rodolfo Kraus, Director del Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene, como Presidente e integrada por los Doctores Carlos F. Maggio Bacteriólogo del mismo Instituto, Fernando Lahille Jefe de la Sección Zoología Aplicada (Ministerio de Agricultura) y Dr. Demetrio Morales Jefe de la Sección Bacteriología del Instituto Entomólogico, a objeto de que estudiaran la eficacia del cocobacilo D'Herelle para la destrucción de la langosta. Este proveyó dos tipos; otro bacilo D'Herelle fué provisto por el Departamento Nacional de Higiene, los que hemos denominado así:

Tipo I. Instituto Pasteur, recogido del Instituto Entomológico de un tubo cerrado a la lampara que decía: cocob a. VII pas 110.912 que resultó idéntico al solicitado directamente del Instituto Pasteur de París.

Tipo II. Del Departamento Nacional de Higiene, procedente de M. D'Herelle.

Tipo III. Del Doctor Morales procedente de pasajes de cocobacilo D'Herelle del Instituto Entomológico.

Las investigaciones del Laboratorio se hicieron con los tres tipos, con el objeto de estudiar su morfología, reacciones colorantes, reacciones biológicas (aglutinación y desviación del complemento) como así mismo su virulencia.

Caracteres culturales de los tipos Pasteur y Departamento

Morfología.—Este microorganismo es un bacilo móvil, Gram negativo, que toma todos los colorantes de anilina, con coloración bipolar, y su tamaño varía entre 0,6 a 1,5 micras, por 0,4, 0,6 micras.

Caracteres culturales.—Agar (placas). A la temperatura ambiente, se encuentra desarrollado entre 14 y 16 horas; las colonias son redondas y a bordes netos, opalescentes de tinte blanquecino verdoso, con ligeros reflejos tornasolados

Gelatina Punción.—Desarrolla en todo el trayecto del anza pequeñas colonias; no licua el medio.

Caldo simple.—A las diez horas es bien aparente un enturba-

miento uniforme. A las 24 y 48 horas, se vé una sedimentación parcial.

Caldo Glucosado.—Desarrolla con abundante desprendimien- de gas. Hetsch coagulación incompleta y vira.

Rojo neutro.—Desarrollo abundante con desprendimiento de gas, virando al rojo amarillento, tomando tintes eosinados.

Drigalsiky.—No vira, las colonias toman el aspecto de una gota de cera.

Papas.—Desarrollo abundante, película cremosa, de color gris amarillento, en el agua de condensación el cultivo es muy abundante. Su coagulación incompleta, vira.

Estos métodos culturales y de coloración, que corresponden con la descripción hecha por M. D'Herelle (e. c.) nos permiten ya distinguir el tipo Departamento y Pasteur, del tipo Morales que resulta algo diferente pues este último tipo no coagula el medio Hetsch, sino después de muchos días.

Diagnóstico biológico.—En vista de que entre los caracteres descriptos anteriormente no había ninguno que pudiera tomarse como especial y que sirviera de guía en las investigaciones posteriores del cocob. D'Herelle, rsolvimos buscar entre los procedimientos biológicos de diagnóstico, aglutinación y desviación del complemento la solución de este problema.

Aglutinación.—Las pruebas de aglutinación fueron hechas con las distintas procedencias del coco-bacilo y usando como suero específico el del cocobacilo del Departamento; más tarde inmunizamos animales con los otros Tipos, es decir con los Bac. Tipo Morales y Pasteur.

Aglutinación con suero de conejo inmunizado con bac. Dept.

Bacterio	Suero Aglutinante				
	1/50	1/100	1/300	1/500	Control
Bac. orig. Depart.	+	+	—	—	—
» » Pasteur	+	+	—	—	—
» » Mor.	—	—	—	—	—

Las prebas de aglutinación muestran bien claramente que los tipos Departamento y Pasteur, son idénticos mientras el tipo Morales es diferente; los dos primeros se aglutinan, mientras que el tercero nó.

Dsviación del Complemento.—La desviación del complemento hecha alternando o cruzando los sueros y bac. de diversas procedencias, muestra tambien como en los casos anteriores que los bac. tipo Departamento y Pasteur son idénticos.

Desviación del complemento. Con suero Mor. Past. y Dep.

I

Antig.	Dept	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	»	+ Amb.	H^2O	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	»	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Mor	+ Amb.	Past.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis

II

Antig.	Dept.	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	»	+ Amb.	H^2O	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Past.	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Mor	+ Amb.	Past.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis

III

Antig.	Past.	+ Amb.	Past	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Mor	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Past.	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Past	+ Amb.	Dep.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Fijón. pcial.

IV

Antig.	Mor	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Fij. compl.
»	Mor	+ Amb.	Past.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Mor	+ Amb.	Dep.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Hemolisis

V

Antig.	Mor	+ Amb.	Mor	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Fijón. pcial.
»	Mor	+ Suero fisiológico	»		+ Sistema Hemol.—Hemolisis
»	Past.	+ Amb.	Past.	+ Compl.	+ Sistema Hemol.—Fijón. pcial.
»	Past	+ Suero fisiológico	»		+ Sistema Hemol.—Hemolisis

CAPITULO V

Investigaciones en langostas sanas y muertas espontáneamente. Presencia de diferentes coco-bacilos. Aglutinación con suero de conejos inmunizados con Bac. tipo Pasteur.—Bacilos que se aglutinan.

Nuestras investigaciones han sido hechas en langosta sana traída de sitios donde nunca se hizo pulverización con bacilo D'Herelle.

La técnica que empleamos es muy simple. Consiste en abrir asépticamente la cavidad abdominal, una vez puesto a descubierto el intestino se perfora con una anza de platino y se hace placas de agar; al cabo de 24 horas en la estufa, se encuentra abundante nú-

mero de colonias; en algunas placas los cultivos eran en apariencia puros, pues, las colonias se asemejan tanto que es imposible hallar diferencia aun examinándolas al microscopio.

Entre éstas colonias, que en su mayor parte son coco-bacilos, algunos tienen caracteres culturales y aspecto microscópico que se parece mucho al coco-bacilo D'Herelle, la semejanza es tan grande que nos ha sido imposible diferenciarlos con el simple exámen de coloración y reacciones culturales, viéndonos obligados a recurrir a los métodos biológicos.

Para mayor comprensión hemos resumido en el siguiente cuadro los caracteres culturales y aspectos microscópicos de los microorganismos mencionados.

II INVESTIGACIÓN DE LANGOSTAS SANAS

Resultado del exámen de los Microorganismos en Langostas vivas

Colonia Nº	Coloración y aspecto	Movilidad	Aspecto de la colonia						
			Agar	Celatina	Neutral rojo	Endo	Caldo glucosado	Drigalsky	Aglutinación
1	Gram negativo	Móvil	Colonia opaca	No licúa	Vira con abundante producción de gas	Vira poco	Producción de gas		Suero Conejo inmu Bac Pasteur negativa
2	Negativo	—	Transparente	No licúa	Vira con desprendimiento abundante de gases	No vira	Produce gas	No vira	» »
3	»	Móvil		» »	Vira con abundante producción de gases	Vira	Produce gas	Vira muy poco	» »
4	»	»		» »	Ninguna modificación	Vira al rojo intenso	Produce poco gas	No vira	» »
5	»	»		» »	» »	Vira al rojo	No produce gas	No vira	» »
6	»	»		» »	» »	Vira poco	No produce gas	Vira muy poco	» »
7	»	»		» »	Vira con abundante producción de gas	Vira	Produce gas	No vira	» »
8	»	»		» »	Abundante producción de gas	Vira	Produce gas	Vira poco	» »
9	»	»		» »	No vira	Vira	No produce gas	No vira	» »

Langostas muertas.—Durante nuestra primera serie de experimentos en Mackenna hemos tenido ocasión de ver una mortandad de langostas que tenía los caracteres de una epizootía; en uno de los cuadros que estaba destinado a la experimentación del cocobacilo de D'Herelle. En efecto al tercer dia de encontrarnos en aquél lugar nos trasladamos al lugar donde debía efectuarse los experimentos, en cuyo sitio observamos con sorpresa que un gran porcentaje de langostas saltona se encontraba muerta.

Los cultivos dieron desarrollo de un microorganismo cuyas reacciones culturales y exámen microscópico resultaban idénticos al cocobacilo D'Herelle y la aglutinación resultó también positiva.

Sanas en Mackenna.—En langostas sanas en Mackenna encontramos también un bacilo idéntico al D'Herelle, en el cuadro siguiente se ve el resultado de la aglutinación.

Sanos II	+	+			—
» IV	—	—			
» Mackenna	—	—			
» VII	+	+	—	—	—
	Aglutinación con Suero Pasteur				
Procedencia de los bacilos	1/50	1/100	1/200	1.500	Control

La aglutinación muestra pues que los tipos de bacilos aislados de langostas sanas son idénticos al cocobacilo D'Herelle lo mismo ha resultado sus caracteres microscópicos, aspecto y reacción en los medios de cultivo.

CAPITULO VI

Virulencia y exaltación de la misma del cocobacilo según indicaciones de D'Herelle

Los trabajos de M. D'Herelle dicen que todo el éxito de la operación está en la virulencia, por lo tanto consideramos que es un punto capital.

M. D'Herelle, no precisa hasta que grado es n ecesario reforzar esa virulencia antes de emplear los cultivos en la práctica; dice simplemente que doce pasajes por langosta de un cultivo de cocobacilo, exaltan suficientemente su virulncia y bastan para realizar con éxito las infecciones en la práctica.

Medición de la Virulencia.—La virulencia aumenta por los pasajes y ese aumento puede expresarse numéricamente; en el cuadro demostrativo de esa operación puede verse que nosotros hemos empleado la cantidad mínima de material para la inyección. La

virulencia que al principio era 1|200 de ansa normal, se exaltó, después de un cierto número de pasajes, llegando a ser 1|20.000 o sea que la dosis de 0.0001 de milígramo mata dentro de las 24 horas, lo que a nuestro juicio, es una virulencia que puede considerarse como máximo, que según M. D'Herelle, es la condición indispensable para tener resultados en la práctica.

Esta virulencia parece conservarse bastante tiempo. Cultivos en tubos cerrados en Diciembre de 1912 en el Instituto Pasteur y abiertos 14 meses después por nosotros tenían una virulencia 1|200, después de doce pasajes la virulencia aumentó a 1|5000 cuyos cultivos han sido empleados en Mackenna.

MEDICIÓN DE LA VIRULENCIA

Fecha	Serie	Nº de lang.	Material empleado	Resultados muertos en:					
				6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	36 h.	48 h
28.1.14	14	8	0.1 de ansa normal de Pasteur	—	—	—	2	—	—
»	15	4	0.01 » »	—	—	—	—	3	—
»	»	4	0001 » »	—	—	—	—	—	—
»	2	4	00001 » »	—	—	—	—	1	—
»	»	4	01 ansa normal de Departamento	—	—	—	2	—	—
»	»	4	001 »	—	—	—	—	2	3
»	»	4	0001 »	—	—	—	—	1	1
»	»	4	00001 »	—	—	—	—	—	1
»	15	4	01 anza normal de Bacterio M.	—	—	—	1	1	2
»	»	4	001 »	—	—	—	—	1	1
»	»	4	0001 »	—	—	—	—	1	1
»	»	4	00001 »	—	—	—	—	—	—
2.11 14	16	3	01. de una dilución de excrementos de muertas 20 pasage Pasteur						
»	»	3	001	—	—	—	—	—	—
»	»	3	0001	—	—	—	—	—	—
»	17	3	0.1 de una dilución de excrementos de muertas por 20 pasages Departamento	—	1	—	—	—	—
»	»	3	001 de una dilución de excrementos de muertas por 2 pasages Depto.	—	—	—	—	—	—
»	»	3	0001 »	—	1	—	—	—	—
»	18	3	00.1 de una dilución de excrementos de muertas por 2 pasages de Mor.	—					
»	»	3	001 »	—	1	—	—	—	—
»	»	3	0001 »	—	2	—	2	—	2
»	A.	3	01 de anza de un Bac. aislado de langosta sana	—					

MEDICIÓN DE LA VIRULENCIA

Fecha	Serie	Nº de lang.	Material empleado	Resultados muertos en:					
				6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	36 h.	48 h.
2.11 14	B.	3	1/10 Bac. de sanas muertas	—	3	—	—	—	—
»	B.	3	1/100 »	—	2	—	—	—	—
27.3.14	1.ª	8	1/100 de anza por inyección Bacterio Pasteur XII pasaje	—	—	—	8	—	—
»	»	8	1/1000 »	—	—	—	8	—	—
»	»	8	1/5000 »	—	—	—	7	—	—
»	»	8	1/10000 »	—	—	—	8	—	—
»	»	8	Control con caldo	—	—	—	—	—	—
28.3.14	2.ª	8	1/100 de ansa por inyección de Bac. Pasteur XII pasaje	—	—	—	—	8	—
»	»	8	1/1000 »	—	—	—	—	8	—
»	»	8	1/5000 »	—	—	—	—	8	—
»	»	8	1/10000 »	—	—	—	—	8	—
»	»	8	1/15000 »	—	—	—	—	8	—
»	»	8	1/20000 »	—	—	—	—	8	—
»	»	8	Control inyectada con caldo	—	—	—	—	1	—

Los tres cultivos de que hemos hablado anteriormente son virulentos para la langosta.

Virulencia y exaltación.—La exaltación de la virulencia ha sido hecha con los cocobacilos de diferentes procedencias: 1° cocobacilo acridiorum D'Herelle, original Pasteur. 2° con los de otras procedencias (Departamento y Doctor Morales) y 3° con los bacilos aislados del intestino de langosta sana, ya de voladora o saltona. Es indudable que el primero tiene para nosotros la mayor importancia y a él, le hemos dado un preferente lugar en nuestras investigaciones.

La exaltación de la virulencia ha sido hecha siguiendo la técnica aconsejada por M. D'Herelle, con la sola diferencia que nosotros hemos empleado, en vez de un cultivo en caldo, un cultivo en agar de 24 horas, emulsionando un ansa normal en 1 cc. de suero fisiológico, tomando esta emulsión en una jeringa Lüer a aguja muy fina con la que inyectamos séries de 9 langostas a la dosis de un décimo de centímetro cúbico en el espacio comprendido entre el tercero y cuarto anillo abdominal; teniendo la precaución de colocar la aguja casi paralelamente al cuerpo de la langosta a fin de no herir los órganos internos, cuya lssión podría ser causa de muerte. Estas series fueron colocadas en bocales de vidrio préviamente esterilizados y con buen pasto.

CAPITULO VII

Exaltación de la virulencia con bacilos cultivados de langostas sanas

Con otros bacterios que resultan tambien virulentos para el acridio, se puede llegar a exaltar su virulencia. Esta operación, como hemos dicho anteriormente tiene frente a nuestra actual misión, menos importancia pero es un hecho curioso que microbios procedentes de langostas sanas y muertas expontáneamente refuercen su virulencia por el método de los pasajs, como si se tratase del cocobacilo D'Herelle.

EXALTACIÓN DE LA VIRULENCIA DE BAC. DE LANGOSTAS MUERTAS EXPONTANEAMENTE

Fecha	Serie	Nº de lang.	Material y dosis	Resultan muertas en:					
				6 h.	8 h.	10 h.	12 h.	18 h.	24 h.
10.2 14	1	8	1 pasage 1/10 de cc de emulsión de materia de muertas expontáneamente en Mackenna	5	—	—	—	—	—
11.2.14	2	8	saltona 2 pasage 1/10 de cc de una dilución de materia fecal de 1 pasage	7	—	—	—	—	—
»	3	8	» 3 pasage 1/10 de cc de id. id. 2 pasage	—	—	8	—	—	—
12.2.14	4	8	» 4 pasage 1/10 de cc de id. id. 3 pasage	—	—	8	—	—	—
»	5	8	» 5 pasage 1/10 de cc de id. 4 pasage	5	—	—	—	—	—
»	6	8	» 6 pasage 1/10 de cc de id. 5 pasage	—	—	8	—	—	—
13.2 14	7	9	» 7 pasage 1/10 de cc de id. 6 pasage	—	—	—	8	—	—
»	8	8	» 8 pasage 1/10 de cc de id. 7 pasage	—	—	—	8	—	—
14.2.14	9	8	» 9 pasage 1/10 de cc de id. 8 pasage	—	8	—	—	—	—
»	10	8	» 10 pasage 1/10 de cc de id. 9 pasage	7	—	—	—	—	—
15.2.14	11	8	» 11 pasage 1/10 cc id. 10 pasage	—	8	—	—	—	—
»	12	8	» 12 pasage 1/10 cc id. 11 pasage	—	8	—	—	—	—

EXALTACIÓN DE LA VIRULENCIA

Fecha	Pasage	Nº de lang.	Material y dosis empleados	Resultados muertos en:				
				6 h. M.	8 h. V.	12 h. M.	18 h. V.	24 h.
9.11.14	1	8	Orig. Past. Materia fecal a solución fisiológica	—	—	—	—	—
10.11 14	2	8	Materia fecal de 3 muertos por origel Pasteur	—	—	—	—	8
10.11.14	3	8	Materia fecal 2 pasage orig. Pasteur	6	—	—	—	—
»	4	8	Materia fecal de 3 pasage orig. Pasteur	5	—	—	—	—
»	5	8	Materia fecal de 4 pasage orig. Pasteur	—	—	8	—	—
12.11.14	6	8	Materia fecal de 5 pasage Pasteur	8	—	—	—	—
»	7	8	Id. id. de 6 pasage Past.	7	—	—	—	—
»	8	8	Id. id. de 7 pasage Past.	—	8	—	—	—
13.11.14	9	8	Id. id. de 8 pasage Past.	—	—	8	—	—
»	10	8	Id. id. de 9 pasage Past.	—	—	8	—	—
14.11.14	11	8	Id. id. de 10 pasage Past.	7	—	—	—	—
»	12	8	Con lla.	—	—	—	8	—

COMPARACIÓN ENTRE LA VIRULENCIA DE LOS DIFERENTES TIPOS DE BACILOS Y DEL TIPO DE BACTERIO ANOTADO DE LANGOSTAS MUERTAS

Fecha	Serie	Nº de lang.	Malerial empleado	Resultan muertas en:				
				6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	36 h.
23.1.14	9	9	1/10 cc. Bact. Past. 12º de 1 anza en 1 cc. de solución fisiol	—	—	9	—	—
»	10	6	1/10 de cc. de diluición de materia fecal de sanas	—	—	—	6	—
»	11	9	1/10 de cc. de diluición de escrementos de muertas con Bac, Mor	—	—	—	9	—
»	12	6	Control—fueron puestos bajo una campana	—	—	—	—	—
»	12	6	1/10 de diluición de escrementos muertas por Bac. Depart.	—	—	—	5	—
»	13	8	Inyección de 1/10 de Bac. de langosta muerta expontaneamente	—	8	—	—	—

Diagnóstico del cocobacilo D'Herelle

Cambio de los caracteres culturales y biológicos del cocobacilo al pasar por la langosta.—Como hemos dicho anteriormente en el intestino de la langosta se encuentran algunos bacterios que se parecen mucho a los de D(Herelle; de aquí la necesidad de buscar un método de diagnóstico seguro.

La aglutinación nos pareció en un principio que facilitaría esta operación, pero si bien es cierto, que este método permite hacer un diagnóstico seguro del cocobacilo D'Herelle original Pasteur, no es lo mismo con los bacilos de pasajes.

Estos bacilos al pasar por la langosta en las inyecciones que se efectúan a objeto de exaltar su virulencia cambian, pues, no fermentan más la glucosa y pierden sus propiedades de aglutinación.

El cuadro siguiente muestra que la aglutinación es negativa, las pruebas han sido hechas ya directamente ya cruzadas.

Aglutinación de:	1/100	1/200	1/500	Control
B. Past. del 3° pasaje con suero aglutinante de Past. original.	—	—	—	—
B. Past. del 3° pasaje con suero aglutinante de Mor.	—	—	—	—
B. M. del 3° pasaje con suero aglutinante Mor.	—	—	—	—
B. Mor. del 3° pasaje con suero aglutinante original Past.	—	—	—	—

CAPITULO VIII

Infección con el cocobacilo por vía digestiva. Experiencias por ingestión en el Laboratorio. Infección del pasto. Ingestión con otros bacterios. Las experiencias por ingestión

Trasmisión por vía digestiva.—Las experiencias por ingestión constituyen la parte fundamental del método de D'Herelle para la destrucción de la langost apor medio del cocobacilo acridiorum; pues la enfermedad se trasmite por vía digestiva y se contagia por los excrementos de las enfermas. Llevando un cultivo a una virulencia máxima, y pulverizadas las yerbas que sirven de alimento a la langota, esta se infectaría rápidamente, no tardando en aparecer en ella, los síntomas característicos de diarrea, propagándose luego a sus congéneres con suma rapidez y muchas veces, a considerables distancias, terminando con la destrucción de la manga en un lapso de tiempo variable, pero que en el peor de los casos no pasaría de 20 días.

Nuestros experimentos de laboratorio para comprobar la in-

fección del cocobacilo por vía digestiva han sido hechas de dos maneras. 1° La infección artificial o directa, es decir, la ingestión de una emulsión de cultivo en suero fisiológico. 2° La infección natural o sea, por pasto fresco pulverizado éste con un cultivo de 24 horas.

Infección directa.—Nada más sencillo que hacer injerir un cultivo a la langosta. Una vez preparada la emulsión se toma en una jeringa de inoculaciones hipodérmicas, en la mano derecha, en la mano izquierda se toma la langosta con su posición natural invertido; ahora bien, dejando caer gota a gota, en la boca de la langosta y esperando que sea deglutida una, antes que la otra caiga, se le puede hacer ingerir varias gotas que contienen cada una, muchos millones de gérmenes. Por ese procedimiento hemos infectado varias series, las que puestas a observación con sus correspondientes testigos no han mostrado ninguna anormalidad hasta el cuarto dia. Algunas langostas, ya del lote de las infectadas, ya de los controles, murieron; por consiguiente era de suponer que esa muerte no era debida única y xclusivamente al cocobacilo, sino que, debiera haber sido otra, la causa y que probablemente fuesen las condiciones de vida anormal a que se le somete estando en cautividad el insecto.

Experiencias por pasto infestado.—La segunda serie de experimentos en el laboratorio por vía digestiva consiste en la pulverización del alimento (alfalfa) con un cultivo de 24 horas.

Se dice que la langosta e ncautividad no come y que por eso es muy difícil hacer esta clase de experimentos en el laboratorio, sin embargo nosotros hemos podido constatar que la langosta se alimenta aún encautividad, pues los tallos y las hojas de alfalfa tierna los encontramos roídos y otros completamente comidos; este pasto fué cambiado diariamente y antes de colocarse en los bocales de cristal en que se encontraba la langosta, se ha pulverizado con un cultivo de 24 horas de un microbio al máximum de virulencia.

Testigos.—Los testigos fueron colocados en las mismas condiciones con pasto fresco.

Los resultados como en el caso anterior han sido negativos a pesar de haberse repetido varias veces la experiencia. En algunos casos se encontró en uno y otro lote, algunas muertas pero sin ninguna particularidad, lo que nos hacía suponer que la muerte no era debida solo al cocobacilo. Los resultados negativos en uno y otro caso que se obtuvieron, fué necesario confirmarlos por una detenida experimentación en campaña, buscando allí, de reunir el mayor número de condiciones a las cuales está acostumbrado el insecto, viviendo en completa libertad y separando aquellas que, sometiéndolas a una vida artificial pudieran por si solo, influir sobre su vida y desarrollo, hasta ocasionarles la muerte.

EXPERIENCIAS POR INGESTIÓN

Fecha	Serie	Nº de lang.	Bacterios empleados y dosis	Resultados muertos en: 6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	36 h.	el 3º dia sobreviven	4 de Abril sobreviven
29.3.14	1	4	Cocob. Past. de pasaje XII	—	—	—	—	1		3
»	»	4	Pasaje XII	—	—	—	—	2	2	1
»	»	4	» »	—	—	—	—	—	4	2
»	»	4	» »	—	—	—	—	—	4	todas muertas
»	2	4	Control 1º	—	—	—	—	—	4	3
»	»	4	» 2º	—	—	—	—	1	3	1
»	»	4	» 3º	—	—	—	—	1	3	1
»	»	4	» 4º	—	—	—	—	2	2	1
»	3	4	Control 5º con ingestión de caldo	—	—	—	—	—	4	todas mueren
»	4	4	Control 6º Infección del pasto	—	—	—	—	—	4	» »

INFECCION POR OTROS BACTERIOS

Fecha	Serie	Nº de lang.	Bacterios empleados y dosis	Resultados muertos en: 6 h.	12 h.	18 h.	24 h.	36 h.	el 3º dia sobreviven	4 de Abril sobreviven
29.3.14	4	4	Tipo Dpto.	—	—	—	—	2	2	
		4	Tipo Mor	—	—	—	—	3	1	
		4	Tipo langosta muertas exp.	—	—	—	—	2	2	

muy distanciado del control con 14 litros de cultivo de caldo de 48 horas y en el término de 5 días se transformaron todas las saltonas en voladoras. Las saltonas restantes no mostraron ningún indicio de enfermedad. Corral VII se había reservado para el control, no se notó nada anormal.

Contra estos experimentos se podría hacer la observación de que la virulencia del cultivo no haya sido suficiente, pero para contrarrestar este caso, hemos efectuado el cultivo de doce pasajes, tal cual como lo pide D'Herelle para los experimentos.

Tercer experimento

El 13 de Febrero, hemos pulverizado el corral II (30 x 11) con doce litros de caldo de 24 horas de cultivo de doce pasajes. La correspondiente observación, pudo continuarse solamente hasta el 19 de Febrero, por habrrse transformado toda la saltona en voladora, comparándolo con el corral X de control no se puede observar ninguna diferencia.

Primer experimento en Tinogasta

Los corrales tenían una dimensión de 10 metros por 30, en los cuales había abundante cantidad de saltona de 0,025 m. m. de largo. Estos corrales fueron hechos en terrenos alfalfados, a fin de que las langostas tuviesen alimentación suficiente.

El 31 de Marzo a las 6 p. m. se pulverizó 10 litros de caldo infectado con original Pasteur, de III pasajes. Hemos observado los corrales veinte días encontrando la langosta en buenas condiciones El dia 28 de Abril se transformaron en voladoras.

Segundo experimento

Este se verificó en Cachiyuyo (Tinogasta) en la finca del Señor Tula.

Experiencia A, hecha en los corrales N° 1, 2 de las mismas dimensiones que las anteriores.

El dia 1° de Abril, a las 6 p. m. se pulverizó con 8 litros de caldo infectado con original XII pasajes.

El dia 5 se encontraron algunas langostas muertas, pero en el control que estaba a 10 metros del infestado se encontró la misma cantidad de muertas.

El dia 14, se notó la misma mortandad en los corrales pero después de esta fecha permanecieron en perfectas condiciones y se transformaron en voladoras el dia 17, 21 y 20 levantaron el vuelo.

Como hemos dicho anteriormente las langostas a veces mueren expontáneamente y de no tener los controles necesarios se podría incurrir en un error.

Experiencia B. Se llevó a cabo en los corrales III y IV de las mismas dimensiones.

Los experimentos por ingestión que se hicieron en el Laborato-

rio y que se ha tratado anteriormente, han dado resultados negativos. Para concluir estos experimentos hemos hecho las siguientes pruebas en el campo.

Se infestaron pedazos de sandía el 3 de Abril con el caldo y se colocaron en distintos puntos del corral, a fin de tener seguridad que se alimentaban todas las langostas.

El día 5 de Abril, se econtraron algunas muertas en el corral infectado y en el control. El día 14 del mismo mes se notó igualmente en ambos corrales pocas muertas, después de esta fecha no se notó novedad ninguna y el dia 20 se transformaron en voladoras.

Este experimento es el complemento del otro y demuestra que la causa de la muerte no está en la infección, por que en los controles se observa lo mismo.

La infeción de los controles no es posible por cuanto se encuentran separados.

Para tener la seguridad de los resultados hemos repetido los experimentos en Tinogasta.

Se hicieron corrales chicos de uno por dos metros. El uno se pulverizó el pasto con cocobacilo orig. Pasteur XII pasaje, el otro como control, la cantidad de caldo infectado que se usó fué de 1 litro. Mantenidos en observación durante 25 días.

Las saltonas se transformaron el 5 de Mayo en voladoras.

Podemos asegurar que los nuevos ensayos hechos con un tiempo po de observación de 25 días, en muy buenas condiciones, han dado resultados negativos.

Resultados

Los resultados de nuestros experimentos son bien concluyentes y pueden resumirse así:

El coco-bacilo D(Herelle con una virulencia aumentada hasta 1|20.000 de ansa normal, no puede producir una infección generalizada con el método de la pulverización.

Los resultados de las experiencias de Tinogasta concuerdan en un todo con los obtenidos en Mackenna.

De los precitados experimentos resulta lo siguiente:

1.° El coco-bacilo D'Herelle se encuentra normalmente en el intestino de la langosta sana; el bacilo cultivado de langosta sana se ha mostrado tambien virulento en las inyecciones abdominales y su efecto es mortal dentro de las 24 horas.

2° En el intestino de las langostas muertas expontáneamente también se encuentra el mismo coco-bacilo.

3 No es posible la infección de la langosta por ingestión de este cultivo.

4° Los experimentos en el campo resultaron negativos.