

## Acerca de la diferenciación del bacilo pestoso

Por LEOPOLDO URIARTE y N. MORALES VILLAZON

La forma clásica del bacilo de la peste, o sea la que muestra condensación bipolar de su protoplasma, contribuye a distinguirlo de otros gérmenes en el examen bacterioscópico de un material que se supone pestoso. Mas esta disposición por no serle exclusiva no puede tomarse como característica indudable para determinarlo con precisión. De ahí que nos parezca imprecisa y ambigua la expresión usada a menudo de que « se observan formas bipolares » para indicar su existencia.

No está demás decir que ese aspecto ofrece en casos algunas variantes que hacen aparecer al bacilo pestoso completamente distinto en el campo del microscopio, pero esas variantes son un motivo para reconocerlo antes que para confundirlo, cuando el que las percibe está ejercitado en su observación.

Dujardin Beaumetz, autorizado loimólogo, ha dicho: « le diag-  
« nostic de la peste et l'identification du bacile pesteux ne necessi-  
« tent pas l'étude de l'action fermentative sur les sucres; en pra-  
« tique, sa recherche est trop compliquée et inutile pour le dépistage  
« de la peste ». Este juicio es en gran parte exacto, sobre todo cuando el material pestoso procede del hombre, y si el bacteriólogo por cauto y experto sabe echar mano de los recursos más habituales de laboratorio para distinguir a este germen. Pero en ciertos casos, por algo dudosos, particularmente cuando se trata de peste de roedores, por razones que ya en otras ocasiones hemos apuntado, puede ser conveniente o necesario llevar a fondo la investigación, reuniendo todos los caracteres eficientes para dar la mayor precisión y fundamento al diagnóstico. Es justamente en esas ocasiones

*Entregado para publicarse en noviembre de 1935.*

que pueden ser útiles algunos hidratos de carbono que indicaremos en el curso de este trabajo.

Por otra parte mucho conviene tener presente lo que respecto a este mismo punto, con atinado juicio, dice d'Ormea: « Ma non potremo mai abbastanza insistere sulla necessita che gli esami siano « condotti da batteriologi provetti e sulla circostanza che delle « persone che non hanno ricevuta una sufficiente istruzione batteriologica, credendo di potersi cavar d'impaccio con un po' di bleu « di metilene e un microscopio, possono andare incontro a delle gravi « disillusioni ».

La investigación de la peste de los roedores en general no es asunto que, por dificultoso que pueda ser en casos particulares, esté erizado de obstáculos insuperables. De ordinario no requiere, a más de alguna práctica, sino proceder con atención y método.

En el curso de unos 20 años se han realizado en el laboratorio de peste de este Instituto 210,906 autopsias de ratas, de las cuales 1,306 eran pestíferas y asimismo se efectuaron crecido número de exámenes de material también pestoso que procedía del hombre y de roedores del campo. En todos los casos hemos llevado a buen término la investigación sin que nos hayamos encontrado en situación de que hechos ulteriores nos obligaran a modificar en sentido contrario los resultados a que habíamos llegado. Además, en algunas ocasiones hemos rectificado las conclusiones establecidas por otros, en casos que éstas habían originado ruidosas medidas de precaución y profilaxis. Con esto no queremos decir otra cosa sino que en tan larga práctica las normas que han sido seguidas han demostrado plenamente que son eficientes y seguras.

Por estos resultados y las enseñanzas proporcionadas por lo que aquí se ha observado, no suscribiríamos la afirmación « de que el « examen microscópico de las lesiones de las ratas es superior al « examen microscópico para descubrir la peste » la cual ha sido repetida en publicaciones y tiene algunos partidarios. Esa opinión emitida hace alrededor de 30 años por la Comisión inglesa de la peste en la India, tal vez fuera modificada por su autor en la actualidad, y no es aventurado considerarla como el resultado de condiciones locales y particulares que aquí no se presentan.

En la gran mayoría de nuestras autopsias las ratas no han mostrado alteraciones de sus órganos y si bien las ha habido con lesiones de origen pestoso evidentes, otras las han presentado tan atenuadas que casi pasaban inadvertidas. Las alteraciones debidas a peste crónica son completamente excepcionales en las ratas de aquí.

Hasta ahora el hallazgo en esos animales, de gérmenes que puedan ser confundidos con el de la peste no ha sido muy frecuente. En cuanto al *B. pseudotuberculosis rodentium* que se cita como el microorganismo que por sus analogías con el de la peste conviene saber distinguirlo, debemos consignar que en el curso de tantos años no lo hemos encontrado en nuestras investigaciones de peste.

\* \* \*

Al investigar peste en los roedores, cuando el examen bacterioscópico es propicio para facilitar el diagnóstico, las inoculaciones y los cultivos son el complemento que sirve para corroborar o rectificar la primera impresión. Si aquella primera operación da lugar a dudas o sólo sugiere leves indicios de que se trate del bacilo pestoso, las dos complementarias practicadas en la forma que ya hemos indicado otras veces <sup>(1)</sup> aclaran generalmente con evidencia la investigación.

El cultivo de medula ósea, aún de roedores en condiciones desfavorables de conservación, permite obtener cultivos de primera mano casi siempre puros, y por tanto recurrir al hecho en caldo peptonado, que es tan ilustrativo, pues el bacilo pestoso da siempre copos sueltos, frágiles, disgregables al menor movimiento, que parece buscaran apoyo en la pared del tubo, en la parte que está en contacto con la superficie del medio de cultivo dejando a todo éste con una perfecta transparencia. Es éste precisamente el carácter que lo distingue de pasteurelas y salmonelas que cultivadas en ese medio lo enturbian uniformemente.

En cambio el de la seudotuberculosis en igual medio se desarrolla como para confundirlo con el de la peste, y aunque aquel, como ya se ha dicho, no lo hemos encontrado hasta ahora en nuestras autopsias, lo hemos estudiado detenidamente repetidas veces por si se presentaba en el curso de nuestros trabajos. Para su estudio nos hemos servido de cepas procedentes del Instituto Pasteur de París <sup>(2)</sup>, clásicas ya por haber servido a distintos autores en varios trabajos publicados en libros y revistas.

---

(1) L. URIARTE y N. MORALES VILLAZÓN. La profilaxis contra la peste bubónica. Un decenio de investigaciones en las ratas. *Rev. del Inst. Bact. del Dep. Nac. de Higiene*. 149. V. Marzo 1928.

(2) Estas cepas fueron aisladas de cobaya, de pavo y de hombre y las debemos a la amabilidad del doctor Dujardin-Beaumetz y una de mono de igual procedencia, debida a la atención del doctor Arena, de este Instituto, a quienes agradecemos el habérmolas facilitado.

Otra contingencia que puede entorpecer la determinación del bacilo pestoso es el hallazgo de una cepa desprovista de virulencia o que ésta sea muy atenuada, hecho muy raro pero que hemos tenido oportunidad de comprobarlo en el curso de nuestros trabajos.

Es en ésta y en otras circunstancias dudosas que la prueba de los hidratos de carbono, tan usada en bacteriología como piedra de toque para distinguir microorganismos puede prestar gran utilidad. Algunos autores han estudiado ya como se comporta el bacilo pestoso con aquellas substancias aunque no en todos esos trabajos se llega a conclusiones prácticas. Por nuestra parte hemos experimentado un gran número de cepas de peste, tratando de precisar las reacciones realmente útiles. En la práctica no hay objeto, ni es posible efectuar gran cantidad de reacciones porque los azúcares que se requieren no se consiguen fácilmente o los disponibles no reúnen las garantías de pureza necesaria y además frecuentemente son de costo elevado.

Hace algunos años indicamos <sup>(1)</sup> el cultivo del bacilo pestoso en agua de peptona con glucosa y rojo neutro, en tubo de Durham, como un recurso que podía prestar servicios en la diferenciación de dicho germen. En ese sentido nos ha sido de gran utilidad y nos sirve igualmente para verificar la pureza de cualquier cepa pestosa que nos inspire sospechas de contaminación, merced a la triade que entonces señalamos. Sin embargo ese cultivo no permite hacer la diferenciación con el B. de la seudotuberculosis. Esta se obtiene usando también agua de peptona pero con ramnosa y tintura de tornasol o bromo cresol púrpura como indicador, que queda invariable con el bacilo pestoso y se pone rosada (tornasol) o amarilla (bromo-cresol púrpura) con el de la seudotuberculosis. La manera de preparar estos medios la hemos dado en otra oportunidad <sup>(2)</sup>.

Diversos autores (entre otros Vourloud, 1909; Swellengrebel y Hoesen, 1915; d'Aunoy, 1923) estudiaron la acción del bacilo pestoso sobre varios hidratos de carbono, uno de ellos la ramnosa, limitándose a consignar como se comportaba esa substancia a la par de

---

<sup>(1)</sup> L. URIARTE y N. MORALES VILLAZÓN. Procédés de culture pour différencier le B. de la peste. *C. R. de la S. de Biologie*, p. 1041, XCI, 1924. De paso diremos que en publicaciones inglesas y francesas en que se cita el procedimiento al transcribirlo se dice que el medio vira al color *amarillento* cuando lo que se obtiene es un color *sofiferino* o *rubi*.

<sup>(2)</sup> L. URIARTE y N. MORALES VILLAZÓN. Un cocobacilo similipestoso en las ratas de Buenos Aires. *Rev. del Inst. Bacteriológico del D. Nac. de Higiene*, V, Jul. 1935.

otras, sin que ninguno de tales autores dedujera concretamente su aplicación en la práctica. Sólo Bessonowa en 1930 <sup>(1)</sup> llamó particularmente la atención de su empleo con ese fin porque daba una reacción diferencial muy constante y segura.

Por nuestra parte hemos estudiado la ramnosa probándola con 94 cepas de nuestra colección, aisladas del hombre y de los roedores, sea en el país o en otras partes, así como también con las 4 cepas de seudotuberculosis aludidas anteriormente y siempre esta substancia ha permanecido invariable dando reacción negativa en los cultivos de peste y por el contrario se ha disociado dando lugar a un cambio de color del medio a causa de la formación de ácido por el desarrollo del bac. de la seudotuberculosis. La consideramos pues, una reacción muy eficaz para esta diferenciación.

Colas Belcour <sup>(2)</sup> para caracterizar esos dos gérmenes ha propuesto el agar-peptona glicerinado y tornasolado por haber encontrado que no variaba cuando en él sembraba el bac. pestoso y en cambio se ponía rosado si la siembra se hacía con el de la seudotuberculosis. Algunos investigadores aducen que esa prueba no tiene constancia. Hemos verificado esa reacción con las 94 cepas de peste y las 4 de seudotuberculosis y dos de las primeras han virado el medio como las segundas, sin haber podido encontrar la causa de este desacuerdo.

Con respecto a la lactosa la mayoría de los autores están concordes en afirmar que no se descompone por la acción del bac. pestoso. Sin embargo Kurauchi <sup>(3)</sup> dice que eso se debe a que no se hace una prolongada observación de los cultivos los que en un plazo de dos semanas muestran siempre un cambio de color señal de que la lactosa ha sido atacada.

Hemos repetido con numerosas cepas de peste la misma reacción en las mismas condiciones de observación y efectivamente después de 12 ó 15 días se produjo una disociación de la lactosa en algunos tubos, no en todos. Siendo ese cambio inconstante y tardío pierde

---

(1) A. BESSONOWA. Peptonwasser mit Rhamnose als differenzierungs nährboden für *B. pestis* und *B. pseudotuberculosis* rod. Pfeifferi. *Centrabl. f. Bak.* 1 Abt. 32-35, CXIX. Dic. 8, 1930.

(2) J. COLAS BELCOUR. Valeur du milieu glicériné dans le diagnostic différentiel des cultures des *B. de la peste* et de la *pseudo-tuberculose* des Rongeurs. *C. R. Soc. de Biol.* 238, XCIV. Janvier 1926.

(3) K. KURASCHI. Fermentation Reactions of *B. pestis*, *B. pseudotuberculosis* rod. and the Hemorrhagic Septicemia Group. Plague Studies IV. *The Kitasato Archives of experimental Medicine*, 89, VIII, N° 2. May 1931.

su utilidad en las aplicaciones de que aquí tratamos y consideramos que la inalterabilidad de la lactosa en los primeros días del cultivo de peste es evidentemente un carácter más útil.

Se han imaginado otras reacciones para diferenciar el *B. pestis* del *B. pseudotuberculosis rodentium* pero por las pruebas que hemos realizado encontramos que no tienen un valor efectivamente práctico.

Otten ha propuesto para diferenciar ambos gérmenes el empleo de la glucosa con tintura de tornasol en agua peptonada. Al efecto utiliza para cada germen cuatro tubos de cultivo y el medio nutritivo de cada uno de ellos contiene cantidades decrecientes de dicho azúcar (0,5 - 0,25 - 0,1 - 0,05). Los gérmenes se diferencian por el distinto grado de acidez que cada uno produce en cada tubo, consecuencia de la cantidad de glucosa, todo lo cual se aprecia por débiles gradaciones de color que toma el tornasol en un mismo tiempo. El procedimiento por fundarse en la percepción de esas pequeñas diferencias del matiz, que no se destacan claramente, se hace de apreciación difícil. Además de las fallas perceptivas del operador hay otros factores que perturban el resultado convirtiéndolo en un método impreciso e inseguro. Ese es por lo menos el juicio que nos merece después de las varias pruebas a que lo hemos sometido.

Lo mismo puede decirse de la reacción aconsejada por Himmelfarb fundada en la rapidez de la descomposición de la maltosa, atacada más prontamente por el seudotuberculoso que por el pestoso. Creemos que estas reacciones diferenciales para que tengan verdadero valor práctico deben apoyarse en un hecho de oposición, de contraste.

El procedimiento propuesto por Fusco, de Nápoles, por medio de la naftilamina y el ácido sulfanílico, para caracterizar los cultivos de peste, nos ha dado resultado negativo a pesar de haberlo repetido en distintas formas, aunque conviene hacer constar la falta de precisión en los datos que el autor da para efectuarlo.

El empleo de la tripaflavina aconsejado por Boncinelli, así como la termoaglutinación se han mostrado incapaces para definir una diferenciación eficaz del bacilo pestoso.

No nos detendremos en otros métodos, entre ellos el de las formas de involución en agar salado de que ya nos ocupamos otra vez, porque después de haberlos estudiado los consideramos por su ambigüedad desprovistos de eficiencia.

Es oportuno hagamos notar que habiendo sometido cultivos de peste y de seudotuberculosis a la prueba del hidrógeno sulfurado

(papel de subacetato de plomo suspendido sobre cultivo líquido), los primeros no han acusado nada, en cambio los segundos sí, dando una evidente reacción positiva después de uno o varios días. Dejamos constancia de esta comprobación porque en varios tratados de bacteriología y en varios estudios del seudotuberculoso publicados en revistas se dice que no produce hidrógeno sulfurado en sus cultivos. Por tanto este carácter puede distinguirlo del de la peste. Lo indicamos a fin de que otros investigadores le dediquen atención y lo verifiquen con sus cepas. Las que nos han servido a nosotros nos merecen entera confianza.

Para resumir los caracteres distintivos del bacilo de la peste expuestos precedentemente, agrupamos los que juzgamos más útiles, concretándolos en el cuadro siguiente:

CUADRO I.

	PESTE	PASTEURÉLAS	SEUDOTUBERCULOSIS
En caldo-peptona	Copos discretos y menudos NO	Desarrollo uniforme SI	Copos abundantes y grandes
Turbiedad	Medio completamente transparente.	Medio completamente turbio	Alguna vez lige- rísima turbiedad
* Ramnosa: ácido gas	Negativa 0	Negativa 0	Positiva 0
Glucosa: ácido gas	Positiva 0	Positiva 0	Positiva 0
Turbiedad	NO	SI	NO
Sacarosa: ácido gas	Negativa 0	Positiva 0	Negativa 0
Hidrógeno sulfurado Cultivo en caldo-peptona Papel subacetato plomo	NO	SI	SI

Como acostumbramos a cultivar el bacilo pestoso a la temperatura de 18 a 28° todas las reacciones hechas con él han sido efectuadas a esa temperatura, mientras las relativas a los seudotu-

(\*) La adonita da iguales reacciones.

berculosos y las pasteurelas se hicieron en la estufa a 37° que es la temperatura más conveniente para su desarrollo.

En el cuadro siguiente (II), consignamos los resultados obtenidos con diversos azúcares y algunos de los gérmenes empleados para estos trabajos. Las observaciones se registraron a las 24, 48, 96 y 120 horas.

Debemos anotar que la cepa seudotuberculosis de mono, aunque ha dado las mismas reacciones que sus congéneres, ha sido más tardía en producirlas. Así en la producción de hidrógeno sulfurado, el papel reactivo recién lo acusó débilmente a los 12 días haciéndose bien aparente a los 15, en tanto las otras cepas (cobaya, pavo, hombre) comenzaron a darla débilmente a las 24 horas y con mayor intensidad en el curso de los días siguientes.

CUADRO II.

	Adonita	Arabinosa	Dextrina	Dulcita	Eritrita	Galactosa	Glucosa	Inosita	Lactosa	Levulosa	Maltosa	Manita	Manosa	Rammosa	Sacarosa	Sorbita	Trealosa
Peste Kimberley	N	P	P	N	N	P	P	N	P	P	P	P	P	N	N	N	P
» Sayavedra	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» Colec. 3	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» Colec. 4	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» cuis 2	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» cuis 11	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» cuis 14	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
» chanch. 685	N	P	P	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	N	N	N	P
Seudotuberc. cobaya	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	P
» hombre	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	P
» pavo	P	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	P
» mono	P <sup>1</sup>	P	N	N	N	P	P	N	N	P	P	P	P	P	N	N	P
Pasteurela																	
» Arsenal naval	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P		P	P	N	P	P	N
» Correo central	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P		P	P	N	P	P	N
» Lignières	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P		P	P	N	P	P	N
» de Aar	N	N	N	N	N	P	P	N	N	P		P	P	N	P	P	N

(1) Tardía — N = Negativa — P = positiva, con producción de ácido pero no gas. Todas las reacciones se hicieron en tubo de Durham. Los azúcares siempre en la proporción de 1 p. 100.

Llamamos la atención acerca de la adonita que ha dado las mismas reacciones que la ramnosa con las cepas de seudotuberculosis (positivas), en oposición a las dadas por el bacilo pestoso y las pasteurelas (negativas). El número de pruebas que hemos realizado con adonita lo consideramos reducido para establecer si esa reacción tiene la debida constancia para que sea realmente útil, pero si un número mayor de pruebas con distintas cepas lo demostrara tendríamos con la adonita otro reactivo, a la par de la ramnosa, para diferenciar el bacilo pestoso del seudotuberculoso.

#### RESUMEN

La investigación del bacilo de la peste en general, no presenta obstáculos insuperables, aunque pueda ser dificultosa en ciertos casos. De ordinario no requiere, aparte de alguna práctica, sino proceder con atención y método.

Cuando por cualquier circunstancia no bastan los recursos más habituales de investigación (bacterioscopia, inoculaciones y cultivos) y se haga necesario mayor número de pruebas para caracterizar el germen en estudio, consideramos las más útiles y prácticas las indicadas en el cuadro I, cuya eficacia hemos comprobado repetidas veces.

También señalamos que la adonita con el B. seudotuberculoso nos ha dado reacciones evidentemente opuestas a las que han dado el B. pestoso y las pasteurelas. Si este carácter de contraste se muestra constante en más pruebas con otras cepas, la adonita, del mismo modo que la ramnosa, prestará gran utilidad en la diferenciación de estos gérmenes.

#### RÉSUMÉ

En general la recherche du bacille de la peste ne presente pas des difficultés insurmontables, quoique elle puisse être un peu laborieuse dans certains cas. Ordinairement à part quelque pratique, elle n'exige que de proceder avec attention et méthode.

S'il arrive que ne soient pas suffisants les moyens plus habituels de recherche (bacterioscopie, inoculations et culture) pour arriver à un diagnostic et qu'il soit nécessaire des épreuves pour différencier le germe en étude, nous avons groupé dans le cadre I celles qu'à notre avis sont plus utiles et plus efficaces d'après les nombreux essais que nous avons réalisés.

Aussi nous signalons que l'adonite avec le B. pseudotuberculeux nous a donné des réactions tout à fait opposées à celles qui nous a donné avec le B. pestueux et les pasteurellas. Si ce caractère distinctif se montre constant dans un plus grand nombre d'épreuves avec les mêmes espèces mais d'autres souches, l'adonite sera très utile, de même que la ramnose, pour différencier ces microbes.

#### SUMMARY

The investigation of the plague bacillus does not offer—in general—any insurmountable obstacle; though it may result difficult in certain cases. Ordinarily, it does not require—out of some practice—anything important, but acting with attention and method.

When —by any circumstance— did not be sufficient the most common means of investigation (bacterioscopy, inoculations and cultures) and it be necessary to yield a greater number of tests in order to characterize the germ under study, we think the most useful and practical it is to adjust to these shown in the preceding Figure I, which in brief, are considered by us as the most efficient, after repeated tests.

We also appomt that the adonite with the pseudotuberculous B. has given us some reactions which are evidently opposite from those given by the pest B. and the pasteurilla ones. If this character should show as constant in further tests with another stubs, we may state that: the adonite, as well as the rhamnose, will be of a great utility in the differentiation ow these germs.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung des Pestbazillus bietet in allgemeinen keine unüberwindbare Schwierigkeiten, obwohl sie in einigen Fällen erschwert sein kann. Mit Hilfe einer gewissen Praxis erreicht man das Ziel, wenn man methodisch und mit Aufmerksamkeit arbeitet.

Wenn aus irgend welchen Umständen die gangbarsten Untersuchungsmethoden (wie Bakterioskopie, Impfung von Meerschweinchen, Anlegung von Kulturen) nicht ausreichen sollten, erachten wir es als das Zweckmässigste, sich an die in der Tabelle I niedergelegten Vorschriften zu halten. Diese Vorschriften betrachten wir, nach wiederholten Versuchen, als die sichersten.

Auch möchten wir darauf aufmerksam machen dass Adonit mit B. pseudotuberculosis uns eine entgegengesetzte Reaktion, als die mit B. pestis und den Pasteurellen gab. Sollte diese Eigenschaft bei einer neuen Versuchsreihe mit anderen Stämmen unverändert bleiben, so könnte das Adonit, so wie auch die Rhamnose, zur Differenzierung dieser Keime herangezogen werden.