

## Acción de la gramicidina (*Dubos*) sobre el bacilo diftérico

Por el Dr. CESAR E. PICO

En 1939 describe RENÉ J. DUBOS un bacilo, aislado del suelo, que tiene la propiedad de producir, especialmente en medios líquidos, una substancia bactericida para una serie de bacterias gram positivas y que, debido a ello, ha sido denominada « gramicidina ».

El bacilo de DUBOS posee los siguientes caracteres: Es móvil, esporulado (esporo terminal), gram positivo en los cultivos jóvenes. Mide  $4 \times 0,5 \mu$ . Desarrolla bien en medios peptonados; en caldos de amplia superficie forma gruesas partículas que luego desaparecen, al cabo de 3-5 días, por autólisis celular. Entonces queda en el fondo un residuo constituido especialmente por esporos y cilias bacterianas. En los medios azucarados y peptonados, el bacilo de DUBOS no produce gas; alcaliniza fuertemente el líquido (hasta pH 9) lo que, tal vez, enmascara la producción concomitante de ácidos en los medios azucarados. No se puede comprobar, en efecto, la producción de ácidos en cultivos a los cuales se ha añadido arabinosa, dextrosa, dulcita, inulina, lactosa, manosa, manita, rhamnosa, sacarosa, salicina, sorbitol o xilosa. La leche tornasolada queda, asimismo, alcalina.

Este bacilo licua la gelatina. Sobre placas de agar-sangre produce una hemólisis difusa. Forma  $H_2S$  en agar acetado. Da abundante catalasa. El « test » de VOGES-PROSKAUER es negativo.

### PREPARACIÓN Y CARACTERES DE LA GRAMICIDINA

Como hemos dicho, el bacilo produce una substancia bactericida cuya preparación y propiedades son las siguientes:

Se siembra el bacilo sobre un medio que contiene:

Bacto-triptona (Difco.)	1 %	} pH 7.
ClNa	0.5 %	
Agua corriente.		

Se esteriliza una vez distribuido en balones que permitan una gran superficie sobre una altura que no debe pasar de 2-3 cm.

Al cabo de 72 h. de permanencia en el termostato a 37°C, casi todas las células se han autolizado. Se filtra entonces el cultivo y se lleva el líquido a pH 4,5; el precipitado se recoge en un filtro y se redisuelve en alcohol a 95° (20 cm<sup>3</sup> de alcohol para el pp. de un litro).

La cantidad de precipitado que da un litro de cultivo alcanza aproximadamente a 0,1 g (\*).

Si se quiere conservar durante mucho tiempo conviene guardarlo en estado seco y en el vacío. Para efectuar los ensayos se diluye la solución alcohólica en agua en la proporción de 1 a 10; a partir de esa primera solución se pueden obtener diluciones mayores en agua alcoholizada al 1/10.

El principio activo — la gramicidina — no dializa por colodion y disminuye su poder bactericida si se lo filtra por bujías de BERKEFELD V. Pasado a través de filtros menos porosos llega incluso a perder su actividad.

Es soluble en alcohol, como se ha dicho, y también en acetona, dioxana, piridina y ácido acético glacial; es insoluble en agua, cloroformo, éter, éter de petróleo, benzol y toluol.

No da reacciones de proteínas, grasas, esteroides e hidratos de carbono. Su constitución química, aún no bien establecida, corresponde a la de ácidos aminados. Da 12,5 % de nitrógeno.

Según DUBOS la gramicidina actúa sobre bacterias gram positivas y no sobre las gram negativas. En sus publicaciones se refiere a una acción evidente sobre neumococos, estafilococos y muchas razas de estreptococos, bacterias a las cuales suspende en solución «buffer» a pH 7,6 y a una concentración de 10.000 millones por cm<sup>3</sup>. Dichas suspensiones son esterilizadas mediante la adición de cantidades variables de gramicidina que oscilan entre 0,01 y 5 mg. También relata DUBOS experimentos *in vivo* donde se demuestra la protección ejercida por la gramicida contra la infección neumocócica de los ratones blancos.

El empleo de la gramicidina en terapéutica consiste, hasta ahora y según nuestras referencias, en la curación de mastitis epidémicas del ganado bovino.

(\*) Este pp. puede purificarse lavándolo sobre el filtro con agua; pero mejor es la técnica siguiente propuesta por DUBOS y que hemos seguido en nuestros ensayos: Se diluye la solución alcohólica en agua al 1/10; esta dilución se rediluye en solución de ClNa al 10 ‰; al cabo de un rato la gramicidina precipita. Se recoge el pp. sobre filtro de papel, se seca y se redisuelve en alcohol a 95°. Con esta solución se efectúan los ulteriores ensayos.

## NUESTROS EXPERIMENTOS SOBRE EL BACILO DIFTÉRICO

En presencia de esos antecedentes resolvimos nosotros estudiar la acción de la gramicidina sobre diversas bacterias gram positivas. La presente comunicación se refiere a nuestros ensayos con el bacilo de LOEFFLER.

Siguiendo la técnica descrita preparamos una solución alcohólica de gramicidina que contenía 0.005 g por cm<sup>3</sup>. Para nuestros ensayos empleamos dicha solución diluída en agua al 1/10. Añadíamos esta solución sobre suspensiones de bacilos diftéricos (1 cm<sup>3</sup> con 5.000 millones de gérmenes). A dicha concentración todas las cepas que usamos, en número de 62, fueron completamente esterilizadas al cabo de 24 horas de contacto a temperatura ambiente.

Para medir el grado de sensibilidad utilizamos diluciones mayores hasta obtener el límite de actividad. Según nuestros experimentos, 0.00005 g de gramicidina matan las suspensiones de bacilos diftéricos en 24 h. de contacto.

Solamente 3 cepas no fueron completamente esterilizadas en ese lapso.

Los resultados pueden verse en la tabla I, en donde 0 significa ausencia de desarrollo; + = muy escaso desarrollo (de 1 a 5 colonias); ++ = desarrollo regular, pero siempre muchísimo menor que los testigos.

Como se deduce de esos ensayos no todas las cepas son igualmente sensibles a la gramicidina, aunque la acción de esta sustancia se manifiesta visiblemente en todas aún después de un contacto de 2 horas a temperatura ambiente.

Investigamos también la relación que pudiera existir entre el tipo de bacilos — gravis, mitis e intermedius — y la sensibilidad de las cepas. Según nuestras observaciones la mayor resistencia acusada por ciertas cepas no tiene nada que ver con el tipo a que pertenecen.

Las colonias resistentes, por otra parte, no presentan diferencias morfológicas con las originales, ni tampoco se advierten modificaciones en el aspecto y comportamiento al gram de los bacilos.

Hemos logrado, no obstante, acostumar los bacilos a la gramicidina sembrándolos en agar con pequeñísimas cantidades de dicha sustancia. Para esto extendíamos sobre la superficie de un tubo de agar 1 ansa de la solución alcohólica original y luego efectuábamos la siembra. Después de sucesivos pasajes — bastan 5-6 — se comprueba un aumento considerable de la resistencia frente a la acción bactericida de la gramicidina. Esos ensayos nos permitieron

TABLA I

Cepa	2 h.	24 h.	Cepa	2 h.	24 h.
708 .....	+	0	2138 .....	00	0
706 .....	0	0	2154 .....	+	0
254 .....	+	0	2105 .....	+	0
251 .....	0	0	2148 .....	+	0
258 .....	++	0	2196 .....	+	0
255 .....	+	0	2191 .....	++	0
259 .....	++	0	2137 .....	++	0
250 .....	++	0	2573 .....	+	0
253 .....	++	0	2568 .....	0	0
256 .....	++	0	2574 .....	++	0
264 .....	++	0	2583 .....	++	0
268 .....	+	0	2562 .....	+	0
252 .....	++	0	2579 .....	++	0
266 .....	+	0	2576 .....	+	0
2125 .....	+	0	2531 .....	++	0
2147 .....	+	0	2561 .....	+	0
2119 .....	0	0	2571 .....	++	0
2113 .....	++	0	2566 .....	0	0
2197 .....	+	0	2559 .....	0	0
2153 .....	+	0	2395 .....	++	++
2136 .....	0	0	2496 .....	+	0
2111 .....	++	0	2461 N .....	0	0
2131 .....	++	0	2394 N .....	0	0
2198 .....	+	0	2466 .....	+	0
2103 .....	++	0	2461 A .....	++	+
2151 .....	++	0	2463 A .....	0	0
2142 .....	+	0	2457 A .....	0	0
2192 .....	++	0	2452 N .....	++	+
2139 .....	++	0	2453 N .....	0	0
2110 .....	+	0	2455 A .....	0	0
LPB .....	0	0	2555 N .....	0	0

0 significa ausencia de desarrollo;

+ » muy escaso desarrollo;

++ » regular desarrollo.

TABLA II

Cobayo N°	Bacilo (cepa)	Gramicidina (mezcla 2 horas antes)	Resultado Días			
			1°	2°	3°	4°
62	708 (Gravis)	—	p. e.	e	+	
42	706 (mitis)	—	»	»	+	
51	PWLBP	—	»	+		
66	708	0.00005 gr.	»	0	0	0
19	706	»	»	0	0	0
54	PWLBP	»	»	0	0	0
		(Contacto simul- táneo)				
965	708	—	e	+		
995	706	—	+			
974	PWLBP	—	e	+		
935	708	0.00005 gr.	p. e.	e	e	+
968	706	»	»	»	»	»
936	PWLBP	»	»	»	»	»

Los cobayos 968 y 936 murieron al 14 y 17 días de la infección, respectivamente

además comparar la sensibilidad del bacilo de LOEFFLER con la de otros gérmenes gram positivos. En efecto, mediante esa técnica, el bacilo diftérico demostró una acusada sensibilidad en el primer cultivo, sensibilidad que no poseían los estafilococos, estreptococos y diplococos de la colección existente en la sección Vacunas de este Instituto.

También hemos efectuado experimentos *in vivo*. Infectamos cobayos por vía subcutánea con suspensiones bacilares lavadas y a la dosis de 1 cm<sup>3</sup> una suspensión total de un cultivo de 24 horas en agar en 10 cm<sup>3</sup> de solución fisiológica.

Un cm<sup>3</sup> de esta dosis infectante se mezcló con 0.00005 g de gramicidina. La mezcla se efectuó ora con 2 horas de anticipación, ora simultáneamente, es decir, en el momento de la inoculación. La misma dosis de gramicidina se inyectó durante 3 días sucesivos.

Los resultados pueden verse en la tabla II.

Advertimos que, a título de curiosidad, estudiamos la acción de la gramicidina sobre la toxina diftérica, pero no obtuvimos ningún resultado.

## CONCLUSIONES

1º La gramicidina de DUBOS esteriliza suspensiones de *C. diptheriae*, a la dosis límite de 0.00005 g para una concentración de 5.000 millones de bacilos por cm<sup>3</sup> en solución fisiológica, a temperatura ambiente y en el lapso de 24 horas de contacto. Sólo algunas cepas — el 4,8 % de las ensayadas — manifestaron alguna resistencia frente a esa dosis.

2º La sensibilidad del bacilo diftérico frente a la gramicidina es notable, según resulta de los ensayos comparativos con cepas diversas de estafilococos, estreptococos y diplococos gram positivos.

3º Se logra mediante pasajes sobre cultivos con gramicidina acrecentar visiblemente la resistencia del bacilo de LOEFFLER contra la acción bactericida de la gramicidina.

4º La gramicidina actúa *in vivo* frente a la infección experimental diftérica del cobayo.

## BIBLIOGRAFIA

- RENÉ J. DUBOS, *J. Exp. Med.* Vol. 70, Nº 1, pág. 1 (1939).  
RENÉ J. DUBOS, *J. Exp. Med.* Vol. 70, pág. 11 (1939).  
RENÉ J. DUBOS, *J. Exp. Med.* Vol. 70, Nº 3, pág. 249 (1939).  
R. B. LITTLE, R. J. DUBOS y R. D. HOTCHKISS, *Proc. of the Soc. f. Exp. Biol. and Med.*, 1940, vol. 44, p. 444.

Agradezco al Dr. SORDELLI el gentil suministro de una cepa de bacilo DUBOS; y a los Dres. MANZULLO y PENINNPEDÉ el de las cepas diftéricas con que ha sido efectuado este trabajo.