

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

REPUBLICA DE GUATEMALA
CENTRO AMERICA

CONTRIBUCION AL ESTUDIO DEL FENÓMENO DE D'HERELLE EN GUATEMALA

TESIS

PRESENTADA A LA JUNTA DIRECTIVA

DE LA

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

POR

FERNANDO BIGURIA S.

EN EL ACTO

DE SU INVESTIDURA DE

MÉDICO Y CIRUJANO

= 4 MAYO 1929

MAYO DE 1929.

GUATEMALA, C. A.

TIPOGRAFIA SANCHEZ & DE GUISE
8ª Avenida Sur N° 24.

Contribución al estudio del fenómeno de D'Herelle en Guatemala.

Historia del Bacteriófago.

Hacia el mes de septiembre de 1917, el profesor D'Herelle dirigía a la Academia Francesa de Ciencias, una comunicación "Sobre un microbio invisible antagonista de los bacilos disintéricos." Fruto de sesudas observaciones, llevadas a cabo desde el año de 1909, la nota mencionada contenía conclusiones henchidas de laboriosa y sustancial experiencia. De cómo se iniciaron y en qué forma tuvieron desarrollo estos acontecimientos, es hecho importante de narrar y que nos revela el tan lógico razonamiento de este felicísimo investigador. Dedicado por aquel entonces, al estudio de una enfermedad contagiosa que atacaba al "acridium migratorium" D'Herelle llegó a establecer que el agente causal era un cocobacilo (*cocobacillus acridium* de D'Herelle) y así mismo se percató de algunos fenómenos que le causaron no poca sorpresa. El cocobacilo, produce en el acridio una septicemia, con predominación de síntomas intestinales (diarrea) en la que se manifiesta de ordinario el agente infeccioso. Cultivando este cocobacilo, recogido del líquido intestinal de insectos infectados experimentalmente en el laboratorio, D'Herelle notó que en los tubos de aislamiento y de resiembra, aparecían colonias con abundantes escotaduras o bien placas vírgenes en medio de colonias confluentes. Asombrado por estos hechos y bajo la influencia de los trabajos de Schweinitz-Dorset, a propósito del Hog Cholera, imaginó que el cocobacilo no era más que un microbio de salida, siendo el verdadero agente causal, algún germen invisible que se oponía en los cultivos al desarrollo de aquel. Intrigado por la duda, practicó inoculaciones con el filtrado y habiendo resultado infructuosas, concluyó que era precisa la intervención de los dos virus visible e invisible, para provocar la enfermedad.

Con la mira de observar si acaecía otro tanto en algunas afecciones del hombre, D'Herelle hizo experiencias,

particularmente con la disentería bacilar y la fiebre tifoidea; pero imbuido de aquella teoría, sirvióse para sus pesquisas de enfermedades en plena evolución y así fué como el fenómeno no tuvo lugar sino de cuando en cuando y ello con bastante rareza. Solo algunos meses más tarde, hojeando sus notas, pudo observar que las irregularidades no tenían nunca lugar en el período inicial de la enfermedad, realizándose en cambio, cuando aquella declinaba. Este hallazgo, lo condujo a examinar las deyecciones del paciente, desde el principio de la afección hasta el período de convalecencia, obteniendo así la observación que sigue:

En un sujeto adulto, enfermo de disentería bacilar grave tipo Shiga, asilado en el Hospital Pasteur, D'Herelle principió por tomar cuotidianamente, diez gotas de las deyecciones y verterlas en un tubo de caldo que pasaba a ocupar la estufa a 37° durante toda una noche; acto seguido, filtraba la mezcla al través de una bujía Chamberland L-2 y diez gotas de este filtrado, eran añadidas a otro tubo de caldo Shiga de 24 horas, que volvía a ocupar la estufa a la misma temperatura.

Durante el tiempo que duró la enfermedad, nada de particular ocurrió en los tubos preparados como antes indicamos; pero uno de tantos días el cultivo quedó estéril, hecho que coincidió con la mejoría del paciente y la iniciación de una franca convalecencia. Al caldo que tenía apariencia de estéril, le adicionó una emulsión de bacilo Shiga, procedente de un cultivo joven en gelosa y a las diez horas de permanencia en la estufa, estaba también completamente clarificado.

Esta experiencia concluyente, desmoronaba su teoría inicial y dejaba ver con nitidez, que las deyecciones utilizadas para preparar el filtrado, contenían un principio capaz de provocar la disolución del bacilo disentérico; con estas nociones, D'Herelle emprendió la experiencia que a continuación consignamos:

Tomando una gota del cultivo lisado y añadiéndola a otro cultivo normal de caldo Shiga, éste aparecía límpido quince horas más tarde. Repitió la operación y notó que a medida que se continuaban los pases sucesivos, se acrecentaba el poder del filtrado, haciendo las lisis más y más rápidas. De aquí dedujo D'Herelle, que el principio se reproducía a expensas del bacilo Shiga y que se comportaba como un microbio capaz de atravesar los filtros; era pues un parásito de las bacterias. Esto sabido, no tuvo

mayor dificultad en obtener cultivos con los caracteres que tanta extrañeza le causaran al principio, bastándole para ello sembrar en gelosa, caldo Shiga adicionado de una cantidad exigua del cultivo lisado (un cien milésimo de c. c.) y así fué como tornaron a verse las colonias carcomidas en su periferia y los islotes formando en su porción central soluciones de continuidad.

Bacteriófago llamó D'Herelle a este principio y Bacteriofagia al fenómeno a que da lugar. Las comunicaciones se sucedieron precisando la técnica y enunciando las distintas enfermedades en que puede aislarse el ultravirus y en su libro publicado en el año de 1921 que lleva como título "El Bacteriófago, su papel en la inmunidad," expuso el conjunto de sus valiosas investigaciones.

No son pocos, los que han querido disputar a D'Herelle la prioridad en el descubrimiento del bacteriófago, coyuntura que ha dado lugar a numerosas polémicas, memorables algunas, como la sostenida con Bordet y Ciuca, en que el autor triunfó sacando a lucir argumentos de indiscutible valor. Apelaban los citados contrincantes, a una publicación que el profesor Twort hizo en "The Lancet" de fecha 4 de diciembre de 1915 y en que se refiere lo siguiente: Habiendo sembrado tubos de agar con linfa de vacuna anti-variolosa, aparecieron colonias de estafilococo (hecho normal) que presentaban áreas de aspecto acuoso y que más tarde se tornaban vítreas y transparentes. Impregnando el extremo del hilo de platino con una de estas colonias y tocando con él la superficie de un cultivo puro de estafilococo, aparecían en el punto de contacto, las mismas zonas transparentes y vítreas, que tendían a propagarse reemplazando en breve todo el cultivo. La constitución de estas colonias según declaró el examen microscópico, era de granos finísimos coloreados en rojo por el Giemsa.

También hacía notar el médico inglés, que el "material vítreo" diluído en agua pura o salada, atravesaba con facilidad los filtros de porcelana y que una gota del filtrado extendida sobre un tubo de gelosa, impedía el desarrollo del estafilococo ulteriormente sembrado (aparecen colonias normales, pero pronto los granos vítreos invaden toda la superficie). Esta enfermedad o condición de los micrococos, dice Twort, puede transmitirse a indefinido número de generaciones y no es dada la posibilidad de cultivar en ningún medio el material vítreo, a pesar de que conserva su actividad por seis meses; así mismo, puede calentarse

sin sufrir alteración hasta cincuenta y dos grados, perdiendo su virulencia si la temperatura se sostiene a 60° durante una hora. Tiene cierta acción, aunque muy atenuada, sobre el estafilococo aureus, aislado de los furúnculos y parece carecer de ella sobre los grupos coli, estreptococo, bacilo de Koch, levaduras, etc.

Así se expresa Twort y responde D'Herelle con sólida argumentación, que no se trata allí de una lisis, de una disolución, ni de una bacteria, ya que el término final de la transformación de Twort es una sustancia vítrea o transparente, formada de finos granos coloreados en rojo por el Giemsa. Hay fragmentación de los cocci, se trata de un fenómeno de bacterioclasis y no de bacteriofagia, que produce una disolución total de los cuerpos bacterianos, sin dar lugar a ningún residuo.

Cuando se vierte una gota del filtrado sobre un tubo de agar, dice Twort, y se siembra en seguida estafilococo, un cultivo normal comienza a desarrollarse, para sufrir después la transformación vítrea que se inicia en algunos puntos y abarca después todo el cultivo.

Procediendo de idéntica manera con el bacteriófago D'Herelle hace notar, que el cultivo que se obtiene está caracterizado por placas circulares que presenta aquí y allá, donde la gelosa carece de trazas de cultivo. Estas placas permanecen inmutables y ni invaden el cultivo, ni son jamás recubiertas por aquél.

Respecto al examen microscópico nunca se observan en la bacteriofagia los granos a que Twort hace referencia.

Para terminar dice D'Herelle: Si el principio descubierto por Twort y el bacteriófago son idénticos, deberían al actuar sobre la misma bacteria (estafilococo) y en análogas condiciones de medio y de temperatura, desencadenar fenómenos también idénticos. Si no lo son, y es el caso, tiene que tratarse de principios diferentes y en consecuencia de fenómenos también diferentes.

Prueba de la argumentación convincente de D'Herelle es el silencio que Twort guardó en dos congresos sucesivos en que se debatiera el problema, quedándole otorgada al primero, la preeminencia en el descubrimiento.

También otros investigadores como Hankin y Eliava señalan hechos particulares. Relata el uno que las aguas de ciertos ríos de la India, poseen una marcada acción anti-séptica para las bacterias en general y para el vibrión cólico en particular; el agua del Juma después de filtrada,

es capaz de esterilizar en cuatro horas una emulsión de vibriones. Hace notar también que la ebullición anula este poder bactericida. Otro tanto observa Eliava respecto a las aguas del Koura y sostiene que jamás este río es vector de epidemias.

No es dudoso que todos estos investigadores, han manipulado el bacteriófago, pero también es cierto que sorprendidos por lo extraño del fenómeno, se han limitado a descubrir algunas de sus fases, sin haberlo estudiado concienzudamente, ni formulado explicación satisfactoria.

“En el terreno de la observación, el azar no favorece sino a los espíritus preparados.” En verdad ¿cuántos no fueron testigos antes que Newton, de ese determinismo ineludible, que quiere que todos los cuerpos abandonados en el espacio sean atraídos por la tierra? Sin embargo solo Newton fué capaz de enunciar la ley de la gravitación universal ¿cuántos no percibieron antes que Galileo el movimiento oscilatorio del péndulo? Pero solo él pudo dar a conocer las leyes que lo rigen. Observar no es sino una fase del descubrir. Significa lo primero, el enfoque de la atención hacia un asunto determinado; la exposición de los datos por este medio obtenidos. En tanto que descubrir es hacer patente una verdad antes ignorada, explicarla, dar en fin, las normas a que se sujeta.

Y la razón se ha abierto paso y el mundo científico otorgando el hallazgo a quien en verdad pertenece, reconociendo la indisolubilidad que ata al descubridor con la cosa descubierta, ha llamado a la bacteriofagia FENÓMENO DE D'HERELLE.

EL FENOMENO Y LAS CONDICIONES PARA SU REALIZACION

El Fenómeno en Medio Sólido.

Tenemos ya sabido por las líneas que anteceden, como se lleva a efecto el fenómeno de bacteriofagia en medio líquido, fáltanos ahora estudiarlo cuando aquel medio se sustituye por uno sólido y para el objeto nos vamos a servir de dos tubos de gelosa ordinaria: En el primero, sembramos por medio de la pipeta, algunas gotas de caldo Shiga reciente, en caldo ordinario y en el segundo, valiéndonos de análogo procedimiento, una mezcla de bacilos de la misma condición, adicionados de un bacteriófago muy activo. Pongamos el todo a la estufa y veinticuatro horas más tarde nos será dado observar, que mientras el primer tubo contiene exuberante cultivo de bacilo Shiga, el segundo ha permanecido completamente estéril. En vez de un bacteriófago muy activo empleemos uno de mediana actividad y notaremos, que si el tubo testigo no difiere en nada del de la experiencia anterior, el otro presenta en el seno de sus colonias, sitios en que el medio está completamente desnudo de cultivo. Estas son las zonas claras de D'Herelle, que afectan forma circular y cuyo diámetro mide en general de dos a cuatro milímetros, advirtiéndolo que sus dimensiones y número están en razón directa con la actividad del bacteriófago así: a mayor actividad, aumento de cantidad y más diámetro, a menor actividad, disminución tanto del tamaño como del número.

Ahora bien ¿qué representan estas zonas claras de D'Herelle? Según su propio parecer y de acuerdo con la mayor parte de quienes han estudiado este asunto, no se trata más que de colonias aisladas de principio bacteriófago, las que a su vez, están constituidas por multitud de corpúsculos vivos e invisibles, cada uno de los cuales se desarrolla y multiplica en el punto en que reside, a expensas de las bacterias. Esta obra destructora, hace que aparezcan en el cultivo zonas que nos dan la impresión de estériles.

Ha demostrado D'Herelle el estado corpuscular del bacteriófago, haciendo diluciones de este producto, hasta

llegar al grado límite de su actividad y enfrentándolo después con bacilos repartidos en varios tubos. En algunos la clarificación es completa, en tanto que otros permanecen normales, lo que prueba la inexistencia de términos medios. Si el bacteriófago se presentara en estado de continuidad, el fenómeno tendría o no lugar en todos los tubos y solo su estado discontinuo, puede explicar también esta discontinuidad en las experiencias.

Bacteriólogos ha habido que arguyan este modo de ver de D'Herelle y dicen que de ser cierta su explicación, ¿por qué la zona de bacteriófago, no invade toda la superficie de la gelosa a expensas del cultivo? Dos razones pueden aducirse para responder esta pregunta: Primeramente una, que es de carácter general y común a la casi totalidad de las bacterias cultivables, consistente en que las sustancias solubles, por ellas producidas, se difunden en el medio y obran a modo de una vacuna en todo el derredor de la colonia, obstruyendo así su mayor desarrollo. Con excepción del género *Proteus* siempre se ve confirmado lo anteriormente dicho. La segunda de las razones es de orden particular y obedece al hecho de que el bacteriófago ataca con predilección las bacterias jóvenes, de tal modo, que el corpúsculo comienza a nutrirse y desarrollarse merced a las bacterias que lo rodean, pero a medida que el tiempo pasa se desarrollan ellas también formando una más densa capa y tornándose de más edad, vale decir, que adquieren más resistencia.

Modalidades del Fenómeno.

No siempre se realiza la bacteriofagia como antes hemos apuntado, veces hay y de ello nos ocuparemos aquí, en que pueden sorprendernos formas particulares.

Diremos en primer término en qué consiste el fenómeno llamado de "ondas sucesivas" para cuya mejor comprensión citaremos un ejemplo: pongamos en la estufa, dos tubos, uno con bacterias, otro con bacteriófago adicionado de bacterias y observémoslos al cabo de algunas horas. En el tubo testigo aparece un cultivo normal, mientras que el conteniente de bacteriófago señala cultivo muy abundante y excesiva turbidez; sobreviene en seguida la lisis y de consiguiente la aclaración del medio, pero a medida que se alarga su permanencia en la estufa, vemos surgir un segundo cultivo al que sucede en breve, una nueva lisis. Estas son

las ondas sucesivas, que pueden repetirse dos y tres veces, hasta que se realiza la destrucción definitiva de las bacterias.

Es posible apreciar otro aspecto curioso del fenómeno y consiste en lo siguiente: Dejando en la estufa una mezcla de bacteriófago y conjuntamente bacterias, la lisis tiene lugar como antes lo indicaremos en un tiempo variable entre veinticuatro y cuarenta y ocho horas. Ahora bien, puede acaecer y no con rareza, que ésta no se haga sino al cabo de ocho o diez días, es decir, que ocurre una lisis retardada. En el curso de las páginas que vienen daremos la explicación de estas dos modalidades, limitándonos por ahora a decir, que el manipuleo constante del bacteriófago, da a conocer muchísimas más anormalidades y si nos hemos limitado tan solo a consignar las dos citadas, ha sido por el hecho de que se repiten con relativa frecuencia.

Estudio Detenido del Fenómeno.

Tres tiempos sucesivos serán objeto de nuestra atención: la fijación del corpúsculo bacteriófago; su penetración en el cuerpo de la bacteria y por último la multiplicación de sus unidades.

Fijación del Corpúsculo.

Preparemos 100 c. c. de caldo Shiga a una concentración de 250 millones por c. c. añadámosle $\frac{1}{4}$ de c. c. de bacteriófago y coloquémoslo en la estufa a 37°. Tomemos inmediatamente y después con intervalos de treinta minutos, una hora y hora y media, veinte c. c. de la mezcla; centrifuguemos separadamente cada una de estas porciones durante diez minutos y a razón de 4,000 circunvoluciones y vertámoslas en cantidad de $\frac{1}{50}$ de c. c. a diez c. c. de bacilo de Shiga en caldo. De cada una de estas mezclas extendamos sobre gelosa $\frac{1}{50}$ de c. c. haciendo seis siembras sobre cada tubo para poder obtener un término medio; tomemos nota de las zonas claras que corresponden al número de elementos bacteriófago y los resultados serán como siguen:

Siembra inmediata: Un promedio de 204 zonas claras equivalente a cinco millones de elementos bacteriófagos por c. c.

Siembra a los 30 minutos: Cinco zonas claras de promedio o sean ciento veinte y cinco mil elementos bacteriófagos por c. c.

Siembra después de una hora: Ocho zonas claras de promedio o sean doscientos mil elementos bacteriófago por c. c.

Siembra a la hora y media: Al rededor de noventa millones de elementos bacteriófago por c. c.

Dos experiencias testigos serán hechas simultáneamente. En la una, el bacteriófago se pondrá en contacto con vibriones coléricos—microbios que este principio es incapaz de atacar—en la otra, con caldo ordinario. Se hará la misma titulación y podremos comprobar que el número de elementos bacteriófago no varía.

Nociones de gran valor se desprenden de las experiencias anteriores, pues merced a ellas nos percatamos de la desaparición de los corpúsculos a los treinta minutos, siendo la razón imperante su fijación sobre las bacterias. Al cabo de una hora, la situación es la misma y a la hora y media sobreviene el abundamiento brusco de elementos bacteriófago, lo cual obedece a la lisis bacteriana que pone en libertad los corpúsculos ya multiplicados.

Tratándose del vibrión colérico, contra quien el bacteriófago en experiencia carecía de acción, el crecimiento no ha tenido lugar, de donde se deduce que la fijación es electiva. También ha establecido por múltiples pruebas, que existe una relación íntima entre la actividad del bacteriófago y la celeridad con que se fija.

Los conocimientos recabados permiten darnos cuenta de lo que acaece cuando en un líquido están presentes, el bacteriófago y una bacteria sensible: o va la bacteria en pos del bacteriófago o lo inverso, pero es lo cierto que el primer acto de la bacteriofagia, consiste en la fijación del corpúsculo sobre el cuerpo de la bacteria. Esta noción de que uno de los dos elementos haya de recorrer una distancia en el seno del líquido que los contiene, explica que todo aumento de la densidad, haciendo más difícil el recorrido retarde o imposibilite la realización del fenómeno.

Reinaba al principio la creencia equívoca, de que la fijación levábase a cabo solo en las bacterias vivas, pero Da Costa Cruz ha demostrado que se lleva a efecto aún tratándose de bacterias muertas, con la condición de que sean sensibles.

En cuanto al fenómeno que pone en contacto el corpúsculo bacteriófago y la bacteria ¿es pasivo o se trata de una quimiotaxia real? Kabelik y Kukula han hecho una experiencia que no puede interpretarse, sino como una qui-

miotaxia real, atributo del corpúsculo bacteriófago en presencia de la bacteria sensible.

He aquí la experiencia en cuestión: Los autores citados idearon un aparato constituido por un tubo horizontal de nueve milímetros de calibre y de veinte y un centímetros de longitud, provisto de siete pequeñas ramas verticales, distanciadas tres centímetros una de otra. En el fondo de los tubos colocaron guijarros muy finos, lavados y perfectamente esterilizados, con el fin de que los líquidos no se desplazaran sino con suma dificultad. Colocando en las diversas ramas del aparato bacilos de Shiga y bacteriófago, pudieron cerciorarse de que mientras los bacilos apenas se habían desplazado, los corpúsculos de bacteriófago habían hecho ya un distante recorrido.

Penetración del Corpúsculo en el Cuerpo de la Bacteria.

Una vez la fijación llevada a cabo ¿se limita el corpúsculo a adherirse al cuerpo de la bacteria o lo invade? Solo el examen microscópico puede hacernos apreciar esta fase de la bacteriofagia, ya que macroscópicamente es de todo punto imposible.

Si en el momento en que la lisis es más intensa, tomamos una gota del cultivo y la observamos en fondo negro, el cuadro es el siguiente: ningún bacilo en vía de desagregación, solo uno que otro se ven aumentados de volumen, tan marcado a veces, que los hace tomar formas esféricas, hasta de tres y cinco micras de diámetro. Si se continúa observando durante unos minutos más, se asiste a una verdadera explosión de la bacteria, que se realiza a penas en una fracción de segundo. El cuerpo esférico ha sido sustituido por un copo difuso que paulatinamente se disuelve, dejando en libertad los finos gránulos.

Esto prueba, que el bacteriófago se desarrolla en el seno de la bacteria, ejerciendo allí su acción, acción interna de dentro a fuera, que justifica racionalmente la forma globulosa y la explosión consecutiva. D'Herelle para explicar la penetración del corpúsculo anota lo siguiente: En primer lugar no se ve ninguna bacteria corroída, todas aún las más globulosas, presentan contornos netos y regulares. Si se coloca una gota entre lámina y laminilla haciéndole presión fuerte como para aplastar las bacterias y se colora después de secado a la estufa, es frecuente ver algo curioso: al rededor de la bacteria bien teñida, se ven dos, tres o más

— 18 —
prolongaciones de colorante y se tiene la impresión de que una parte de su contenido ha escapado por uno o más orificios.

Esta observación, apoya la teoría de que la pared del cuerpo de la bacteria, ha sido perforada por uno, dos o más corpúsculos.

Multiplicación de los Corpúsculos.

Ya en el seno de la bacteria, los corpúsculos se multiplican, formando una colonia que al explotar aquella, queda en completa libertad para fijarse en otros elementos y principiar de nuevo su ciclo de multiplicación.

Para D'Herelle este fenómeno se lleva a cabo por golpes sucesivos, oponiéndose a otros pareceres que sostienen la forma progresiva del crecimiento. "El crecimiento del número de corpúsculos no se hace de manera progresiva continua, dice el descubridor del bacteriófago, sino por rupturas de bacterias que sucesivamente los ponen en libertad."

La magnitud de la multiplicación está sujeta a diversos factores, pero el más importante reside en el número de bacterias prestas para ser atacadas, ya que constituyen el medio de cultivo para el bacteriófago.

La Trasmisión Indefinida en Serie.

Este es uno de los caracteres más importantes y que mayormente sorprenden en el estudio del fenómeno. Tanto D'Herelle como los demás experimentadores han podido llevar a efecto la siguiente prueba: Inocular con un milésimo de c. c. del principio, diez c. c. de caldo Shiga. Una vez la lisis realizada, se filtra y con un milésimo de c. c. del producto filtrado se vuelve a practicar la experiencia; así por centenares de veces (D'Herelle 1,200). Siempre el fenómeno se realiza, con esta particularidad de que a medida que se han hecho pases sucesivos, el principio acrece su facultad de atacar a las bacterias.

Los Cultivos Secundarios.

Suele acontecer, sobre todo cuando se trata de cultivos de bacilo Shiga o de estafilococo, que después de una limpidez consumada, sucede un enturbiamiento, tenue al

— 19 —
principio y más evidente a medida que el tiempo discurre. Si se practica el examen microscópico de los mencionados cultivos se podrá notar, que los elementos componentes son bacterias distintas, tanto en su morfología como en sus reacciones biológicas de las bacterias normales. La explicación más satisfactoria que se ha dado de este fenómeno, está basada en la resistencia espontánea o adquirida de ciertas bacterias y corrobora esta manera de pensar la siguiente experiencia: si se someten a lisis diez centímetros cúbicos de caldo Shiga y se reparten en diez tubos de caldo estéril, a razón de un centímetro cúbico para cada tubo, el cultivo secundario aparece solamente en dos de ellos, lo que viene a demostrar que sólo algunos de los microbios han soportado el ataque del bacteriófago y han quedado aptos para desarrollarse. Ahora bien ¿sufre el bacteriófago alguna modificación cuando este fenómeno tiene lugar? No se ve modificado en nada y basta para confirmar lo dicho, practicar una nueva filtración, cuyo objeto será retener el bacilo y permitir el paso solo al principio bacteriófago.

Ciertas sales tienen una influencia decisiva en la aparición de los cultivos secundarios, tal sucede con el acetato de plomo, el nitrato y el sulfato de plata; así mismo la tienen los cultivos viejos, que con facilidad da lugar a este fenómeno.

Tres medios hay para desembarazarse de los tales cultivos: la centrifugación, el calentamiento y la filtración.

La centrifugación no se aplica en el campo de la práctica por sus muchísimos inconvenientes; el calentamiento a 56° si bien aniquila las bacterias resistentes, tiene en cambio el grave defecto de alterar las propiedades del principio bacteriófago; por último, queda la filtración, que constituye por su eficiencia, el método empleado por todos los bacteriólogos.

Antes de cerrar este capítulo, hemos de mencionar un hecho sumamente importante y que aún no ha sido estudiado a conciencia. Si se filtra con todas las precauciones para evitar la infección, una mezcla de bacilo Shiga y bacteriófago, cuando ya la limpidez perfecta ha tenido lugar, se obtiene un producto absolutamente claro; pero a los cuatro días una ligera turbidez que se acentúa notablemente al sexto, suele aparecer en el filtrado. El germen que se encuentra, no es otro que un bacilo de Shiga, muy poco distinto del que aparece en los cultivos secundarios. D'Herelle a la cabeza y después una serie de investigadores han

tenido oportunidad de observar este fenómeno. El hecho de que solo se verifique en presencia de bacteriófagos poco activos, ha dado lugar a una hipótesis que explica el caso, como un ataque incompleto a la bacteria, la cual reducida a finos corpúsculos, es capaz de atravesar el filtro y reconstituirse después por un "proceso desconocido."

Nosotros nos atrevemos a hacer esta sugerencia: Bien podría tratarse no de una agresión incompleta contra la bacteria, que de alguna consideración tendría que ser para reducirla a corpúsculo filtrable, influyendo indefectiblemente sobre su vitalidad; sino una forma de resistencia que aquella adoptara, en presencia de bacteriófagos escasamente virulentos. Creemos que esta manera de ver, explica más satisfactoriamente el desarrollo y crecimiento ulterior de la bacteria filtrable.

Este hecho de la filtrabilidad de ciertos gérmenes, ya hoy demostrada para el bacilo de Koch y algunos más, tiene honda repercusión en el concepto que hasta la actualidad teníamos acerca de la fijeza morfológica de las especies bacterianas, base sobre la que reposa la ciencia bacteriológica. En efecto, ha sido costumbre catalogar los microbios, tomando como un punto de partida esencial, los caracteres de su forma; imaginemos cómo ésta podrá alterarse si un germen que no es filtrable, se puede tornar tal! Ultimamente, el doctor Rafael Morales ha hecho estudios muy importantes en lo referente al carácter protéico del bacilo Búlgaro, llegando hasta poner en evidencia su marcada movilidad, merced a prolongadas pestañas que recuerdan al bacilo tífico.

Estos valores recién adquiridos, imponen una revisión minuciosa de la morfología de los microbios.

Influencia de la Temperatura Sobre el Fenómeno.

El grado óptimo para la realización de la bacteriofagia es de 37°; en tales condiciones la aclaración del medio tiene lugar en un tiempo mínimo de tres horas. A 20° tiene lugar en un promedio de diez y seis horas y a medida que la temperatura descende se hace cada vez más tardía hasta no verificarse a 0°. Respecto a las cifras elevadas acaece otro tanto y en llegando a 44° el fenómeno ya no se realiza.

Esto es muy lógico, pues ya hemos visto que el bacteriófago actúa sobre bacterias en plena vitalidad y es esta una condición que requiere una temperatura media de 37°.

Influencia de la Composición del Medio.

Todos los medios que de ordinario se emplean en bacteriología son favorables: caldo simple, agua peptonada, gelosa, etc. No lo son en cambio los medios ácidos o capaces de engendrar fermentaciones, pues como pronto veremos, la acidez es uno de los factores que obstruyen la acción del principio. Respecto a los medios sintéticos, D'Herelle los ha empleado con éxito, mereciendo especial cita: el agua fisiológica al 8½ por mil y la solución de 25 miligramos de soda en 1,000 grs. de agua químicamente pura.

Influencia de la Concentración en Iones H.

Si bien los técnicos han manipulado bacteriófagos que ejercen su actividad en medio ácido, ello no debe tomarse como regla y ha de ser considerado el medio alcalino, como el de elección para que tenga lugar el fenómeno en sus mejores condiciones.

Influencia de la Aerobiosis.

A este respecto podemos decir: que la bacteriofagia no está supeditada a la presencia o ausencia del oxígeno y que todo depende de que la bacteria en cuestión sea viable en medio aerobio o anaerobio.

Influencia de la Viscocidad del Medio.

Tenemos por sabido que la bacteriofagia implica contacto de la bacteria con el principio, noción importante que nos da idea del papel que puede jugar la viscosidad del medio. En las diluciones fuertes de albúmina y de gelatina, el fenómeno no tiene lugar y solo se efectúa a medida que aquellas van siendo menos y menos concentradas. Hecho trascendental, que afirma la idea de contacto y de parasitismo intracelular.

Influencia de los Productos de la Lisis.

Respecto a los productos de la lisis, es hecho comprobado que ponen obstáculo a la actividad del bacteriófago; tan es así, que en los medios donde muchas lisis han tenido lu-

gar, llega un momento en que el fenómeno ya no se realiza, debido quizás a una vacunación como la que ocurre en los medios de cultivo.

Influencia de la Cantidad de Bacterias Lisables y su Estado.

Los principios bacteriófagos más activos pueden ejercer su acción sobre líquidos que contienen 500 millones de bacterias por c. c. Tratándose de más cuantiosas cifras la lisis no tiene lugar. Respecto a las condiciones apropiadas para que la bacteriofagia se efectúe, dos son las esenciales: vitalidad y juventud.

PROPIEDADES DEL BACTERIOFAGO

Estado Físico y Constitución.

Dado que el bacteriófago se presenta en forma de finos corpúsculos, suspendidos en el seno de un líquido, bien podemos asimilar su estado al de la materia coloidal. La dimensión de tales corpúsculos se ha llegado a determinar, merced a varios e ingeniosos procedimientos basados todos en la filtración y parece ser que las cifras obtenidas fluctúan al rededor de veinte *milicrones* para cada uno.

Respecto a la constitución íntima del bacteriófago, es de creerse, por las experiencias llevadas al efecto, que se trata de una nucleo-proteína.

Acción de la Pesantez.

Ya por obra del tiempo, ya por centrifugación muy rápida, el bacteriófago es susceptible de ocupar las capas profundas del líquido que lo contiene. Tal lo ha probado D'Herelle, dejando en reposo por el lapso de once meses una de sus muestras y haciendo en estas circunstancias el recuento de corpúsculos, tanto en la superficie, como en el fondo. Procediendo así, obtuvo las cifras que siguen: 280 millones por c. c. en la superficie y 2,900 millones por c. c. en el fondo. También es dable observar una sedimentación parcial gracias a la centrifugación muy veloz.

El Bacteriófago Atraviesa los Filtros.

El principio que estudiamos, es capaz de pasar al través de los filtros de porcelana, por cerrados que sean sus poros, a través de los sacos de colodión y también de las membranas de Haen. Goza esta propiedad de importancia trascendental, pues ya hemos visto que en ella estriba la técnica de su aislamiento.

Invisibilidad del Bacteriófago.

Hasta ahora y empleando todos los métodos de coloración y de observación microscópica que en la actualidad poseemos, no ha sido posible ver elementos figurados en las diluciones de bacteriófago.

Los corpúsculos que valiéndose del ultramicroscopio han encontrado algunos autores, no son más que residuos bacterianos y en prueba de ello, si se practica una filtración delicada, no vuelven a encontrarse los mencionados corpúsculos que en manera alguna desaparecerían si formarían parte de la constitución del bacteriófago.

Acción del Calor.

Este agente físico, ejerce su acción sobre el bacteriófago en dos formas: ya sea anulando su acción temporalmente, es decir sin destrucción de su vitalidad, ya sea matándolo. Si por ejemplo se toma un bacteriófago que se ha calentado lo suficiente, para que su efecto lisante y la aparición de manchas claras en gelosa ya no se verifiquen, existe la posibilidad de devolverle ambas particularidades, bastando para ello enfrentarlo varias veces con el agente que era capaz de lisar y practicando un filtrado entre una y otra operación. Procediendo en tal forma, se observará que al cabo de cuatro o cinco filtraciones el principio ha recobrado su poder lítico, con tanta intensidad, como la poseía al principio.

El hecho es sumamente curioso y ha sido explicado de la manera siguiente: Para que haya lisis es necesario un complejo, constituido de un lado, por el bacteriófago, sustancia viva y capaz de reproducirse; por otro, de una sustancia nacida del microbio. Viene el calor a disociar el complejo y la lisis ya no se efectúa; devolvámosle la sustancia emanada del microbio y volverá a reconstituirse el complejo.

Hauduroy después de larga y escrupulosa tarea, acerca de como influye el calor sobre el principio lítico ha llegado a una serie de conclusiones cuya síntesis exponemos a continuación:

(a) No puede fijarse una temperatura determinada para destruir la acción de todos los bacteriófagos. Así, de tres principios anti-Shiga: el primero pierde su poder lítico después de cinco minutos a 90° ; el segundo después del mismo tiempo a 60° y el tercero en iguales circunstancias a 70° .

(b) Hay un estrecho paralelo entre el poder lisante de un bacteriófago y su resistencia a la temperatura, tanto uno como la otra acrecen en la misma proporción.

(c) No existe relación alguna entre la temperatura que aniquila un bacteriófago y la requerida para matar el microbio lisable.

(d) Un bacteriófago calentado, no vuelve a recobrar su poder lítico, a menos que sea sometido a las manipulaciones antes referidas.

Ahora bien ¿cuál deberá considerarse la temperatura mortal para un bacteriófago? Si de medio húmedo se trata, al rededor de 100° ; si de calor seco, 135° poco más o menos. Diremos para terminar que sometido un bacteriófago a la temperatura mortal, no hay medio capaz de devolverle su virulencia y esta temperatura es la misma para todos los tipos estudiados.

Adsorción del Bacteriófago.

Cabe el mérito de haber hecho notar el poder inhibitorio del negro animal sobre el bacteriófago, a Poorter y Maisin, quienes hacia el año de 1920 hicieron sus primeros ensayos. Más tarde Maisin prueba, que si a una dilución de bacteriófago se agrega sulfato de amonio a media saturación, el precipitado que se forma engloba el principio bacteriófago. De Necker ha hecho experiencias al respecto, con diversos coloides y soluciones coloidales: Iodargol, electromanganol, electroselenio, electrocuprol, electrargol y electrorodio. El procedimiento de que se ha valido, consiste en diluir un centímetro cúbico de bacteriófago, en ocho centímetros cúbicos de caldo y agregarle un c. c. de cualquiera de los citados coloides, filtrando al cabo de veinticuatro horas. Los resultados obtenidos denotan una disminución de mil veces la actividad primitiva del bacteriófago. Dudando si se trataba de un fenómeno de adsorción, Poorter hace uso del hidróxido de aluminio, cuerpo intensamente adsorbente y comprueba que el fenómeno se verifica con diez veces más intensidad que en las experiencias anteriores; disuelve después el hidróxido transformándolo en acetato y el bacteriófago así libertado, vuelve a ejercer su influencia; hecho que viene a demostrar que el fenómeno es de adsorción y no de destrucción.

Experiencias similares se han llevado a cabo con coloides de naturaleza animal, tales como el suero de caballo, el suero de perro, etc., siempre con idénticos resultados.

También son dignas de relato las experiencias de Jau-main y de Mlle. Meleuman, últimamente comprobadas por Da Costa Cruz, referentes al carácter específico de la adsorción. Si se toman tres tubos de colifago y se agrega al primero caldo simple, al segundo estafilococos muertos y al tercero colibacilos también muertos, se podrá observar filtrando al cabo de tres días de permanencia en la estufa, que los bacteriófagos contenidos en los dos primeros tubos persiten activos, mientras que el tercero, ha perdido esta condición.

Es de advertir que la adsorción no constituye una propiedad física única del bacteriófago, ya que la poseen también en alto grado los fermentos solubles, las toxinas microbianas y los demás ultravirus.

Acción del Tiempo.

El factor tiempo ejerce sobre el bacteriófago una acción apenas sensible y prueba de ello es, que al través de muchos años (cinco y hasta diez) han podido conservarse muestras cuya virulencia casi no ha sido afectada.

Acción de los Antisépticos.

A continuación exponemos una tabla, que contiene los resultados obtenidos enfrentando el bacteriófago, con los varios antisépticos; pero queremos hacer antes una consideración de orden general y es la propiedad que tiene el principio de acostumbrarse a vivir en contacto de aquellos. Es decir, que goza de la facultad de adaptación. La glicerina por ejemplo es un tóxico para el bacteriófago, pero si como lo ha hecho Bablet, se le somete primeramente a la acción de soluciones débiles que se van concentrando de manera paulatina, llega un momento en que el principio puede vivir perfectamente en glicerina pura. Otro tanto y de igual modo puede lograrse en cuanto a los medios ácidos y los sueros anti-bacteriófagos.

Este poder de adaptación, de mutación con las exigencias del medio, constituye una de las cualidades inherentes a los seres vivos y ya más adelante veremos que es uno de los sólidos argumentos en que se apoya la doctrina del bacteriófago como poseedor de vida.

Sustancias estudiadas	Concentración	Efectos
Yoduro de potasio		Acción variable con los distintos bacteriófagos.
Sulfocianuro de potasio		
Cloruro de manganeso		
Fluoruro de sodio	1 p. 100	No mata el bacteriófago.
Vapores de formol		Destruyen más pronto el bacteriófago que las bacterias.
Glicerina	A saturación	Mata el bacteriófago.
Tetralina		Mata el bacteriófago.
Bicloruro de mercurio	1 p. 200	Lo mata en cuatro días.
Sulfato de cobre	1 p. 100	Lo mata en cuatro días.
Acido fénico		Lo mata en siete días.
Liq. sat. de esencia de tomillo y de clavo		No lo mata.
Optoquina		Ninguno de estos antisépticos mata el bacteriófago, sin embargo le impiden manifestar su actividad,
Eucopina		
Bucina		
Quinosol		
Yatren		
Tripaflavina		
Vivanol		
Verde de malaquita		

Acción de la Quinina.

El efecto que la quinina ejerce sobre el bacteriófago es intensísimo, como que una solución de cualquiera de sus sales al 1 por 100 lo aniquila en unas pocas horas; y lo que acontece in vitro, se repite igualmente in vivo. Noción muy importante, de donde se desprende la consecuencia práctica, de evitar la quinina en los individuos tratados por el bacteriófago y también otra que muy directamente nos concierne, por el hecho de que viviendo en un medio en que la infección palúdica es endémica, nos vemos obligados a usar la quinina con gran profusión y es que solo debemos administrarla después de un estudio concienzudo de la enfermedad que se nos presenta, so pena de no conseguir ningún beneficio para el paciente y de disminuir en cambio su poder de defensa.

Tal es la importancia que este asunto entraña, que en lo que se refiere a tifo malaria, hay legislaciones que prohíben el empleo de la quinina, en tanto no se haya formulado un diagnóstico de seguridad.

Acción del Radium.

La irradiación de 0'914 grs. de radium, apenas atenúa la virulencia del bacteriófago, de donde puede deducirse que su acción es casi nula.

Acción de los Rayos Ultravioleta.

Estos ejercen una acción brutal sobre el principio, inactivándolo del todo, al cabo de diez minutos. Autores hay, que opinan que la sensibilidad del bacteriófago y de su bacteria respectiva, son idénticas sometidos a esta acción, pero el hecho no ha sido aún comprobado.

Polivalencia del Bacteriófago.

Cuando se tiene un bacteriófago y se ensaya su poder lítico, es hecho de observación frecuente que no solo ejerce su influencia sobre una bacteria dada, sino sobre un crecido número, así difieran los grupos a que pertenecen. Por ejemplo: un bacteriófago activo contra el bacilo Shiga, podrá a su vez atacar al bacilo Coli y al estafilococo; en la práctica es imposible decir hasta donde llega la polivalencia, ya que sería necesario para ello, enfrentarlo con una infinidad de bacterias. Si existe una polivalencia innata al bacteriófago, también se puede lograr que la adquiera, bastando para ello ponerlo en contacto varias veces con un agente bacteriano y filtrando después de cada operación. Así es posible ver, al cabo de cierto tiempo, que la muestra antes inactiva contra el agente en cuestión, ejerce después una influencia sorprendente.

Después de lo dicho, expondremos cuáles son hasta hoy las especies conocidas como sensibles a la bacteriofagia: B. Shiga, B. Hiss B. Flexner, Pastereulla bovis, B. Pestis, B. Tiphosus, B. Gallinarum, Paratiphosus A. Paratiphosus B. B. suipestifer, B. enteritidis, B. tphi muriun B. coli, Neumo bacilo de Friedlander, B. proteus, B. diphterie, B. subtilis Vibrion colérico, Stafilococo, enterococo y estreptococo.

Modo de Cultivo.

A diferencia de las bacterias que se desarrollan en el seno de la materia muerta (gelosa simple, gelosa sangre, suero coagulado, etc.), el bacteriófago está incapacitado para vivir en cualquiera de estos medios, por nutritivos que sean; solo a expensas de las bacterias vivas puede mantenerse y desarrollarse, exigiendo hasta la condición de que sean de siembra reciente. Estos hechos que aproximan el bacteriófago a los demás ultravirus, nos permiten conocer mucho de su complicada biología.

LOS MICROBIOS RESISTENTES Y LISOGENOS, EL SUERO ANTI BACTERIOFAGO

Los microbios Resistentes.

Cuando en el curso de este estudio hicimos referencia a los cultivos secundarios, adquirimos el conocimiento de que a veces el bacteriófago es incapaz de lisar ciertas bacterias; son las que precisamente han adquirido el epíteto de bacterias resistentes.

Nos ocuparemos ahora de ellas, haciendo mención en primer término de su morfología, que les imprime un carácter genuino. En los tubos de caldo y a la simple vista, ofrecen la particularidad de no enturbiar el medio y de formar en el fondo un sedimento considerable, que difícilmente se mezcla con el resto del líquido.

Al examen microscópico, verdaderamente sorprende el cuadro que se nos presenta: en vez de la forma bacilar, los gérmenes resistentes han adoptado una forma absolutamente distinta, convirtiéndose en cocos que miden de tres a cuatro micras de diámetro; en diplococos y reuniéndose a veces en grupos de cuatro, como si fuera bacilo tetrágeno. Haciendo un trasplante de la colonia a otro medio de cultivo, (caldo o gelosa) vuelven a aparecer las formas bacilares típicas, al lado de las cuales persisten formas anormales; entre otras, bacilos largos, cortos, curvilíneos y en fin gránulos más o menos finos. Todos estos aspectos, dice D'Herelle, dan la impresión de un organismo que se reproduce por esporogonia. Autores hay que piensan se trata de una forma sexuada de reproducción, hasta hoy desconocida para las bacterias. Respecto a reacciones bioquímicas, las de la bacteria resistente difieren mucho de la bacteria normal y en cuanto a vitalidad, hay elevado porcentaje en favor de la primera. Los hechos referidos, vienen a corroborar lo que antes dijéramos, acerca de la revisión de ciertos capítulos de la bacteriología.

Las Bacterias Lisógenas.

Hay otro grupo de bacterias poseedoras de las mismas propiedades que las resistentes, pero cuya significación biológica es distinta. Se trata de una convivencia del bacteriófago con la bacteria; aquel se adhiere al cuerpo de ésta sin destruirla y protegiéndola contra el ataque de cualquier otro bacteriófago. Según algunos pareceres, es el caso de una simbiosis a base de beneficios múltiples, pero en el estado actual de nuestros conocimientos, no es posible responder con certeza a esta cuestión. Por lo demás, la bacteria lisógena disemina el bacteriófago por doquier, dando lugar por esta circunstancia a muchas causas de error, permitiendo tan solo la filtración su aislamiento.

Como veremos en breve, hay la posibilidad de anular este carácter de lisógena que posee la bacteria, mediante la aplicación del suero antibacteriófago.

El Suero Antibacteriófago.

Si tomamos una liebre o conejo y le hacemos cada seis días una inyección subcutánea de un cultivo lisado y filtrado, aumentando progresivamente la dosis, podremos observar en el suero obtenido a los quince días de la última inyección, algunas propiedades, que por su especial carácter le hacen llamar suero antibacteriófago. El suero en cuestión goza de propiedades múltiples y ello debido en parte, a lo complicado del antígeno inoculado, rico en múltiples elementos, como son: Bacteriófago, sustancias bacterianas disueltas, productos de secreción (endo y exo toxinas) y probablemente las sustancias con que el bacteriófago ocasiona la lisis. Esta complejidad, hace que el suero obtenido posea los siguientes y variados atributos:

- (a) Aglutinar las bacterias susceptibles de ser atacadas por el bacteriófago en cuestión.
- (b) Poseer una sensibilisatriz específica para el principio lítico.
- (c) Neutralizar la acción del bacteriófago.
- (d) Anular el carácter lisógeno de las bacterias pertenecientes a este género.
- (e) Hacer más sensibles a la infección, a los animales inoculados con el bacteriófago específico.

Ingeniosos procedimientos realizados por múltiples experimentadores, han venido a comprobar la veracidad de los curiosos caracteres del suero antibacteriófago.

NATURALEZA DEL BACTERIOFAGO

El conocimiento de las sorprendentes propiedades del bacteriófago, ha dado lugar a que los investigadores se pregunten con afán ¿en qué consiste, cuál es la constitución íntima de este principio? ¿será una diastasa, una sustancia química, o un ultramicrobio? Gran número de teorías han sido la respuesta de tan inquietante interrogación, que D'Herelle reduce a tres grupos, donde todas ellas tienen cabida.

- (a) El bacteriófago puede ser un principio químico, extraño a la bacteria que sufre la lisis.
- (b) Un principio químico o vivo, procedente de la bacteria que sufre la lisis.
- (c) Un principio vivo, ajeno a la bacteria que sufre la lisis.

Nos ocuparemos de exponer en qué consisten y en qué han sido basadas estas diferentes apreciaciones, así como las réplicas de que han sido objeto.

El Bacteriófago, Principio Químico Extraño a la Bacteria.

Para Kabeshima, el bacteriófago sería una sustancia catalisadora, emanada de los leucocitos y presente en el intestino, que actuando sobre una prodiastasa contenida en las bacterias, acarrearía su lisis.

Anna Kuttner piensa que se trata, no de un producto leucocitario, sino de una enzima de origen grandular, apoyando su teoría en el hecho de que las maceraciones en glicerina, de hígado y de intestino, contienen bacteriófago si son filtradas al cabo de once días.

Ninguna de estas doctrinas que consideran el bacteriófago como de naturaleza química puede tenerse en pie, ante el argumento de que el principio ejerce su acción indefinidamente en serie y regenerándose a expensas de las bacterias. El bacteriófago que así se multiplica, no puede bajo ningún concepto ser de orden químico. Además, D'Herelle y Hauduroy, han aislado del intestino de tíficos y coléricos un principio, que dando lugar a lisis, no trasmite su acción en serie; al cabo de cierto tiempo y debido a las diluciones se

ha tornado inactivo. No se sabe a ciencia cierta que significación tenga esta sustancia, pero probablemente es la misma que han manejado los autores que proclaman la naturaleza química del bacteriófago ajena a la bacteria lisada, doctrina como hemos visto no satisfactoria, por estar en pugna con la experimentación.

El Bacteriófago, Principio Químico o vivo, Procedente de la Bacteria.

Esta apreciación ha dado lugar a tres teorías distintas: una que considera el principio procedente de la bacteria y como una autolisina normal; otra como una autolisina anormal y la tercera como una forma filtrable de la bacteria y capacitada para destruirla.

(a) Diversos autores entre los que figuran Davinson, Pico, Weimberg y Aznar, Da Costa Cruz, Leddingham, Otto y Finkler, Bordet, etc., han sostenido con algunas variantes esta doctrina. Hay un punto en el que todos están de acuerdo: la autolisina que da lugar a la acción en serie, requiere para producirse por primera vez, una influencia exterior, bastando ella, para que el principio siga actuando y multiplicándose indefinidamente. Se trata pues, de un acausa determinante que ponga en libertad la autolisina, la cual en contacto con un cultivo bacteriano, lo ayuda a destruirse, dando así lugar a nueva autolisina, que introducida en otro cultivo volverá a jugar el mismo papel.

Pico, haciendo filtrados de pancreatina comercial, ha observado que este producto realiza la disolución del bacilo Shiga, de donde su idea de atribuir a este jugo glandular la influencia determinante. Combiesco ha rebatido esta experiencia, diciendo que personalmente ha encontrado bacteriófago en la tripsina y en la enteroquinasa y que el procedimiento usado por Pico no elimina el bacteriófago, sino al contrario lo aísla.

Weimberg y Aznar, han obtenido la lisis filtrando cultivos de bacilo Shiga, gozando el principio que estos autores han aislado de idénticas propiedades que el bacteriófago.

Bordet, ha conservado por algún tiempo un colibacilo, no poseedor de bacteriófago y ha observado que al cabo de los días gozaba de acción lítica. Piensa este investigador, que al llegar a cierto grado de evolución, puede ocurrir un

antagonismo entre los distintos gérmenes de la misma especie, lo que daría lugar al nacimiento de un principio autolítico.

Las ideas expuestas han sido como ahora veremos objeto de dura y razonable crítica. D'Herelle, ha sido uno de los primeros en dar a conocer los microbios capaces de provocar la lisis y si son frecuentes tratándose de algunas especies, es en cambio muy difícil encontrarlos tratándose de la generalidad, estafilococos, disintéricos, etc.

Si la autolisina en cuestión fuera normal, las bacterias que lo originan deberían también serlo. Sabemos en cambio que las propiedades bioquímicas de los gérmenes lisantes, son completamente distintas de las que caracterizan a la bacteria corriente. Por otra parte, la autólisis normal se realiza al quinto o sexto día y se hace más intensa a medida que pasa más tiempo, no llegando jamás a dar por resultado una transparencia completa del medio. El fenómeno de D'Herelle en cambio, se lleva a cabo en pocas horas, acciona sobre cultivos jóvenes y da por resultado una perfecta limpidez del medio.

Respecto a la teoría de Bordet, de lucha entre los gérmenes del cultivo, los autores que la han investigado no la han observado nunca, a pesar de que han tenido a la vista múltiples semillas por largo espacio de tiempo. Si se toman varios tubos conteniendo cultivo de estafilococo y se cierran a la lámpara, dejándoles exigua cantidad de aire, puede ocurrir que al cabo de los días la turbidez desaparezca; pero cuando se ensaya la acción en serie ésta jamás se verifica.

Vemos pues, cuán lejos están estos fenómenos de parecerse a la bacteriofagia de D'Herelle y como las hipótesis de la autólisis normal, no resisten el embite de las objeciones expuestas.

(b) Bordet y Ciuca emiten esta hipótesis: los leucocitos tienen una acción sobre los microbios consistente en viciar su metabolismo y serían en este sentido el primun movens del fenómeno. Basan sus ideas en la experiencia que sigue: inyectando en la cavidad peritoneal de un cavia cobaya, un cultivo vivo de colibacilos y retirando el exsu-

dado por punción, se obtiene un líquido rico en glóbulos blancos, que tiene la facultad de lisar el bacilo Coli. Si se toman unas gotas del cultivo lisado y se vierten en otra siembra de Coli, vuelve a aclararlo y así sucesivamente, lo que Bordet y Ciuca explican, diciendo que el vicio nutritivo es hereditario.

Las objeciones que tal doctrina ha sufrido, son conocidas. En primer término, la experiencia inicial es muy rara; muchos sabios han tratado de realizarla sin haberlo logrado nunca. Además, si como sostienen Bordet y Ciuca los leucocitos son el *primun movens*, lógico sería encontrar el principio lítico en los glóbulos blancos de los animales preparados para suministrar suero antidisentérico, lo que no se ha verificado nunca a pesar de la vehemente búsqueda de los investigadores. Por último, dice D'Herelle, refiriéndose al vicio hereditario: después de pasado por el filtro, ninguna bacteria se encuentra en el producto, que a más va a obrar sobre microbios jóvenes y en pleno goce de su vitalidad “¿cómo evocar la herencia cuando no hay descendientes?”

(c) Ha sido Bail quien por primera vez ha sostenido la teoría de la bacteria filtrable. Para él, los microbios adoptarían dos formas: una normal; vegetativa; perceptible a la vista, constituida por los cocos, bacilos, etc. Y otra forma filtrable que tendría la propiedad de destruir las bacterias.

Esta doctrina es del todo errónea, pues si por una parte la bacteria resistente puede adoptar la forma filtrable, tiene por otra, propiedades especialísimas que le conceden un carácter muy particular. Además, el bacteriófago es como antes lo vimos, polivalente; lo que no es admisible si nos afiliamos a la doctrinas de Bail, ya que cada bacteria debería poseer su forma filtrable específica. Existen indudablemente formas bacterianas filtrables, pero no son la causa del fenómeno, sino antes bien, una de sus consecuencias.

Eliminadas las teorías del bacteriófago como principio químico, extraño a la bacteria que sufre la lisis y del bacteriófago como principio químico o vivo procedente de la bacteria, que no explican las múltiples propiedades del

principio; no nos queda si no acogernos a la última “el bacteriófago como principio vivo, extraño a la bacteria,” noción que como veremos, está de acuerdo con los múltiples hechos experimentales.

El Bacteriófago, Principio Vivo Extraño a la Bacteria.

Antes de entrar en materia, cabe la siguiente pregunta: ¿cuáles son las condiciones inherentes a la función vital? D'Herelle las reduce a dos, poder de asimilación en medio heterogéneo y adaptación posible a las condiciones adversas de este medio. “No podemos dudar, dice el sabio francés, que un carnero posea vida; asimila la hierba y la transforma en sustancia carnero. Tampoco es posible dudar de la vitalidad de un estafilococo, asimila la gelosa o el caldo sobre el cual se cultiva y lo transforma en sustancia estafilococo.” El bacteriófago se desarrolla y se reproduce, de donde la certeza de que se apropia de los elementos del medio externo y los asimila. Aunque sea invisible ¿no posee acaso las condiciones de los seres vivos? Algunos autores han argumentado que las bacterias no eran para el bacteriófago un medio heterogéneo, pero las múltiples experiencias realizadas en este sentido, prueban de manera evidente la autonomía del citado principio. También posee la otra condición y en muy alto grado; ya antes nos hemos referido a su poder de adaptación ante los antisépticos y en especial tratándose de la glicerina. Aún hay otra variedad de adaptación y es la capacidad que tiene el bacteriófago de ejercer su influencia sobre microbios primitivamente resistentes.

Vemos pues, que el bacteriófago tiene condiciones para ser considerado como poseedor de vida y que de todas las teorías expuestas, es la única que está de acuerdo con los hechos. Es por tanto, un ser vivo, filtrable y que se desarrolla a expensas de materias también vivas. Caracteres todos que lo acercan al grupo de los ultravirus, los cuales constituyen por hoy uno de los más oscuros capítulos de la biología ¿cuál es su naturaleza íntima? ¿Se debe su invisibilidad a la pequeñez de nuestros alcances, a la inferioridad de nuestras técnicas o a otras razones? A todas estas dudas solo el progreso de la ciencia podrá responder.

¿Cómo Obra el Bacteriófago?

“Es indudable que el principio no ejerce la lisis por su sola presencia; si no mediante diastasas líticas.” (D’Herelle).

Muchos investigadores, echando mano de variados medios, se han ocupado de aislar estas lisinas, pero hasta hoy sus pesquisas han resultado infructuosas. Hauduroy piensa, que el no haberlas puesto de manifiesto hay que achacarlo, no a su ausencia, sino a lo deficiente de los métodos con que hoy se cuenta. Vemos pues, que no existe ningún hecho experimental al respecto, lo cual autoriza para tantear en el terreno de la hipótesis.

Recientemente D’Herelle da la siguiente explicación: El bacteriófago penetrando en el interior de la bacteria, pudiera ser que provocara las mismas reacciones normales que determina la presencia de una espora, es decir, la autodisolución de la bacteria parasitada.

Esta no es más que una teoría, que ningún hecho viene a apoyar, así es, que en verdad lo que hoy sabemos referente a la manera de actuar del bacteriófago, bien poco es y se reduce a lo siguiente:

Necesidad de contacto entre la bacteria y el ultramicrobio y vitalidad del microbio lisible.

EL BACTERIOFAGO Y LA INMUNIDAD

D’Herelle por primera vez y basado en el hecho de que el bacteriófago apareciera de manera constante, en las heces de convalecientes de algunas enfermedades infecciosas, se preguntó si el principio no jugaba algún papel en la inmunidad. Encaminado en este sentido, llevó a término felices y muy trascendentales experiencias, que le proporcionaron la confirmación de su idea y que por las verdades innegables que aportan a este ramo del saber, nos ocuparemos de referir en seguida.

El Bacteriófago en el Individuo Sano.

Practicando el filtrado de las heces de una persona en pleno goce de salud, durante largo espacio de tiempo y enfrentando el producto con gérmenes diversos, obtuvo D’Herelle, en veintitrés ensayos los siguientes resultados: Bacteriófago activo diez y siete veces contra Coli, cuatro veces contra Shiga, dos contra Flexner, una contra Hiss, una contra Lara A., tres contra Lara B. En muchos casos el filtrado fué inactivo, pero pertinaz D’Herelle en la idea de que el bacteriófago estaba presente, lo puso en contacto con una salmonelosis y con bacilo enteritidis de Gaertner, obteniendo entonces una lisis perfecta. De aquí concluyó que el bacteriófago es un huésped normal del intestino y que la dificultad técnica de su investigación, estriba en ponerlo en contacto con el germen que es capaz de lisar. No se le encuentra nunca en el feto ni en el niño de menos de diez días. Estas aserciones han sido comprobadas por Dumas y Hauduroy en muchas ocasiones. Nosotros lo hemos buscado y no en balde, pues uno de los bacteriófagos que han servido para nuestras experiencias, procede de las heces de un niño completamente sano y resultó activo contra el bacilo Coli aislado del mismo sujeto.

Cuando la investigación se lleva a cabo en medio epidémico se nota algo de particular, y es que en tal caso, se encuentra siempre un principio muy activo contra el germen causa de la epidemia. En cambio en las poblaciones indemnes, no aparece nunca bacteriófago activo contra

gérmenes epidémicos. En París no se observa el bacteriófago antipestoso, en tanto que en Indochina se pone de manifiesto con suma regularidad. Lo mismo sucede con los lugares infectados por los bacilos tíficos y paratíficos y con los agentes de la disentería bacilar. Cabe pensar, que quizás nos vemos infectados frecuentemente por todos estos gérmenes y que sea el bacteriófago, siempre poseedor de alguna virulencia específica, quien sale en nuestra defensa. Podría así mismo el bacteriófago adquirir una marcada actividad, lo que explica el hecho de inmunidad adquirida sin afección anterior.

El Bacteriófago en la Enfermedad.

Los estudios iniciales fueron realizados por D'Herelle y Hauduroy en la fiebre tifoidea. Más tarde, hacia el año de 1927, D'Herelle, solicitado por el gobierno de la India para estudiar la epidemia de cólera que por aquel entonces hacía estragos espantosos en dicho país; logró llegar a conclusiones que fueron acogidas con especial interés y asombro en los círculos científicos.

En lo referente a fiebre tifoidea hasse establecido lo siguiente:

1°—No se encuentra el bacteriófago, sino cuando la temperatura principia a descender y persiste hasta que la defervescencia termina.

2°—El más alto grado de actividad del bacteriófago, principia cuando se inicia la defervescencia.

3°—Si la temperatura se eleva el principio torna a aparecer.

4°—Los resultados obtenidos han sido constantes y aquellos casos en que el bacteriófago no se encontrara, fueron mortales.

Idénticas comprobaciones lleváronse a término con las varias disenterías bacilares y con las colibacilurias; lo que autoriza a declarar: que cuando en una enfermedad infecciosa, se pone de manifiesto el principio bacteriófago activo contra el germen en cuestión, el paciente mejora y entra en vía de recobrar la salud.

He aquí la transcripción de las conclusiones acerca del estudio de la epidemia de cólera en la India, tomadas de un artículo que D'Herelle publicara en la "Presse Medicale" del 1° de agosto de 1928.

1°—En una región que ha permanecido por mucho tiempo indemne del cólera, no se encuentra bacteriófago virulento para el vibrión colérico ni vibriones no aglutinables, seudo coléricos.

2°—En una región donde reina una epidemia de cólera, un cierto número de poblaciones donde ningún caso se ha manifestado anteriormente, se contaminan en forma simultánea por vibrión seudo colérico y por bacteriófago virulento para el vibrión colérico real. Tales poblaciones parecen inmunes y a pesar de la epidemia que azota a su alrededor, permanecen indemnes.

3°—Los vibriones no aglutinables, seudo coléricos, resultan de una mutación del vibrión colérico bajo la influencia del bacteriófago. A pesar de la pérdida de su poder patógeno, algunas de estas razas son todavía sensibles al bacteriófago anticolérico que puede reproducirse a sus expensas.

4°—Si en una región reina una epidemia, es imposible señalar en la mayoría de poblaciones no infectadas la presencia de bacteriófago anticolérico y ellas son propicias para el desarrollo de la epidemia.

5°—En el curso de las epidemias estudiadas en los diversos sitios, en tanto que al principio no se hallaba el bacteriófago en el medio, al cabo de algunos días se le podía aislar en el agua de los pozos y en los cuerpos de las moscas capturadas. Es de advertir que el principio era inmensamente virulento contra el vibrión colérico y lo seudo coléricos. Estos sitios, sensibles primitivamente, se tornaban en el curso de la epidemia como las villas inmunes y desde este momento era de notarse que aquella decrecía, hasta cesar cuando la contaminación por el bacteriófago era general.

De los hechos referidos se desprende: que el principio, la marcha y la cesación de una epidemia, dependen del grado de contaminación respectiva, de los vibriones patógenos y los bacteriófagos contra estos virulentos. Y que en el cólera como en las demás enfermedades epidémicas, el bacteriófago es la causa directa de la inmunidad y de la curación, siendo ésta contagiosa al mismo título que la enfermedad.

El Bacteriófago en los Animales.

En los animales sanos, es muy frecuente encontrar bacteriófagos activos contra los bacilos para a, para b y los bacilos disintéricos; pero lo más digno de atención es el estudio de las epizootías, en las cuales se repiten exactamente los mismos hechos que en las epidemias. En breves líneas, hablaremos de los resultados observados por D'Herelle en la tifosis aviaria, que como sabemos es producida por un germen bacilar muy parecido al bacilo tífico, salvo en la movilidad.

En un gallinero donde no hay ni ha habido tifosis, se puede encontrar bacteriófago activo contra distintos gérmenes, pero nunca contra el bacilo Gallinarum.

En un gallinero infectado, los animales enfermos carecen de bacteriófago anti Gallinarum, en tanto que los demás lo poseen con marcada actividad.

En un gallinero que ha sido infectado los supervivientes poseen por largo tiempo bacteriófago activo contra el bacilo Gallinarum.

Los estudios de la septicemia hemorrágica de los búfalos (Barbone) han culminado en conclusiones similares.

Volvemos pues, a percatarnos, del papel que juega el bacteriófago, tanto en la curación como en la inmunidad, gracias a la adquisición de una virulencia elevada que le permite destruir el germen infectante.

No se trata en todo lo dicho de simples caprichos imaginarios, sino de experiencias cuantiosas y convincentes, llevadas a cabo con el más estricto rigor científico y que los investigadores han podido repetir a su antojo sin objetar la más leve refutación.

Hecho innegable es, que el bacteriófago interviene con preponderancia en los varios procesos que conducen a un sér, de la sensibilidad a la inmunidad, de la enfermedad a la curación y que quizás concede también la inmunidad natural.

Juntamente con la inmunidad celular y la humoral, únicas hasta ahora conocidas y que bien podríamos llamar endógenas, existe otra inmunidad exógena, cuya representación es el bacteriófago. Y en lo que a inmunidad local se refiere no sería de extrañar que fuera el bacteriófago quien en ella interviene ¿no tiene acaso el ultravirus de Besredka múltiples puntos de contacto con el bacteriófago? ¿no se trata también de una sustancia filtrable que resiste

al calor, que goza de especificidad y que puesta en contacto con estafilococos, o les impide crecer o crecen con suma dificultad? No sería extraño, volvemos a repetir, que en el fondo, ultravirus y bacteriófago fueran un mismo principio.

Todos nuestros conocimientos acerca de la inmunidad, estaban basados en la refriega librada entre los gérmenes invasores y las células o humores de nuestro organismo. Hoy venimos a saber que cuentan estos defensores de la salud, con un aliado poderosísimo, el parásito de los parásitos, el principio bacteriófago.

No podemos decir más, el estado actual de nuestros conocimientos no nos autorizan sino para bosquejar estos problemas, sin permitirnos ahondar sus factores íntimos; pero terrenos vastísimos se dilatan ante los investigadores, que habrán de sorprendernos con sus conquistas al través de los tiempos.

APLICACIONES TERAPEUTICAS DEL BACTERIOFAGO

En dos formas cabe el uso del bacteriófago en terapéutica; ya sea como preventivo de una enfermedad, ya como agente curativo de ella. Dos técnicas posibles, hay para lograr el efecto preventivo. Basada la una, en el poder lítico del principio y la otra en las propiedades vacunantes de las proteínas microbianas, puestas en libertad bajo la influencia del bacteriófago.

Este último proceder, ha sido aplicado por D'Herelle en la septicemia hemorrágica de los búfalos, con resultados brillantísimos, que auguran lo eficiente que puede ser esta forma de tratamiento cuando sea aplicada a las enfermedades humanas.

La septicemia hemorrágica es una afección gravísima, que ataca con predilección al búfalo y en quien produce de manera indefectible la muerte. D'Herelle, valiéndose del cultivo de la bacteria en cuestión, lisado por el bacteriófago, destruye este principio, e inyecta el cultivo a los búfalos concediéndoles una inmunidad "vecina del estado refractario" llegando hasta lograr que los animales resistan la inoculación de 2,000 dosis mortales. La inmunidad en estos casos requiere cierto tiempo y está sujeta a la cantidad inyectada y a la edad del animal.

Se ve claramente en la experiencia citada que no hay intervención lisante del bacteriófago; sino que todo se debe a la acción de las sustancias producidas por la lisis, de las proteínas microbianas transformadas por el bacteriófago. Aún hay algo más, D'Herelle ha puesto en evidencia que el suero de un animal inmunizado con el bacteriófago, posee propiedades preventivas de gran intensidad, lo que según su criterio debe ser estudiado con la mira de conseguir sueros terapéuticos que a la dosis de una inyección, produzcan resultados eficientes.

Aprovechando la acción lítica, son dignos de mención los resultados preventivos logrados en la tifosis aviaria. En varios gallineros contando al rededor de mil ochocientos animales se desarrolló una epidemia fortísima, a tal extre-

mo que ya los casos mortales habían alcanzado la elevada cifra de 400. Los 1,400 animales restantes, recibieron dosis del principio bacteriófago y no se volvió a registrar más que un caso fatal; caso que fué tratado con un principio que no ejercía acción lítica sobre el germen específico. Mientras tanto en los gallineros testigos, la epidemia prosiguió su obra devastadora.

Cuando consideramos, que la tifosis es mortal en ciento por ciento de los casos al iniciarse la epidemia y en noventa y cinco por ciento, cuando pasa el estado esporádico, podemos apreciar el indiscutible valor del procedimiento empleado.

En el cólera asiático los resultados obtenidos por D'Herelle no son menos sorprendentes. A continuación, citamos lo acaecido en algunas villas de la India, durante la reciente epidemia.

En Kot Anderson con 800 habitantes y surtida por agua potable de cinco pozos, principia el cólera el 20 de agosto, registrándose el día 24 veinte casos. En la misma fecha, se vierten cuarenta c. c. de bacteriófago en cada pozo, reproduciéndose hasta el 27 nueve casos más. Se hace una investigación rigurosa y resulta de ella que so pretexto de sacar un portamonedas, uno de los pozos había sido vaciado y una vez lleno la población acudió a surtir de sus aguas. Volviósele a adicionar bacteriófago y no se registró ningún caso más.

Narwar, con dos mil habitantes, alimentado por veintidós pozos, y donde aparece el cólera el 2 de agosto. El día 4 ya se cuentan doce víctimas, de las que seis mueren. La población alarmada acepta las medidas que se le proponen, en virtud de lo cual dos de los pozos principales reciben 30 c. c. de bacteriófago y los demás son adicionados de permanganato de potasio en cantidad suficiente, para que su agua no sea potable. Los seis enfermos curaron y no se volvió a presentar ningún otro caso.

Piensa Hauduroy ante el brillante éxito alcanzado, que tratándose de ciertas epidemias y de ciertas enfermedades endémicas, debería agregarse el principio bacteriófago a las aguas de consumo de los centros atacados.

El gobierno de la India halagado por la eficiencia del bacteriófago, rogó al profesor D'Herelle que enviara un jefe de laboratorio, conocedor de la técnica, para aplicar el procedimiento en gran escala. Decidió también dicho gobierno, de acuerdo con los ruegos formulados por el comi-

té de expertos de la peste, reunidos en Calcuta en diciembre del año próximo pasado y bajo los auspicios de la Sociedad de las Naciones, que se llevaran a cabo investigaciones acerca del bacteriófago en relación con la peste Bubónica, siguiendo método análogo al que se usó en la epidemia de cólera.

El Bacteriófago como Agente Curativo.

He aquí las afecciones en que hasta la actualidad han sido empleadas las propiedades curativas del principio bacteriófago:

Tifosis aviaria.—Los resultados pueden resumirse así: 100 animales enfermos son tratados con una inyección de 5 decigramos de bacteriófago, advirtiéndose que algunos la reciben ya casi agonizantes. Noventa y cinco sobreviven y solo cinco perecen, de modo que la mortalidad se reduce del 100 por 100 al 5 por ciento.

Disentería Bacilar.—D'Herelle principió por tratar siete casos de infección bacilar tipo Shiga, obteniendo al cabo de 24 horas de la ingestión del bacteriófago: disminución de los síntomas generales, disminución de los asientos y ante todo la desaparición del bacilo Shiga. Eliminada la causa, la enfermedad cesó terminando la convalecencia al cabo de cinco o seis días.

Davison y Otto y Munter, no han obtenido resultados satisfactorios, pero Da Costa Cruz publica veinticuatro observaciones de enfermos tratados por el bacteriófago en ingestión, iniciándose la mejoría a las cuatro o cinco horas y la curación a las veinticuatro.

Tan eficaz resultado, hizo que el Instituto Oswaldo Cruz preparase bacteriófagos que pone a disposición de los médicos, para luchar contra la disentería. Recientemente el mismo autor ha publicado los resultados obtenidos en el tratamiento de diez mil enfermos y la conclusión a que llega es la siguiente: "el bacteriófago disintérico es el mejor agente terapéutico de las disenterías bacilares hasta el presente conocido. Su acción supera a la de los demás medicamentos, comprendiendo los sueros, pues la mayor parte de las veces los síntomas disminuyen considerablemente entre cuatro y ocho horas y el enfermo entra en convalecencia después de veinticuatro." Pereira ha tratado ventitrés disintéricos con igual éxito.

No puede pedirse confirmación más sorprendente de las experiencias de D'Herelle.

Infecciones de Bacilos Tíficos y Paratíficos.—Berckrich y Hauduroy, hicieron los primeros ensayos tratando doce casos, en el curso de una epidemia que revestía caracteres muy graves. El resultado obtenido, consistió en una atenuación notable de la fiebre tifoidea, estableciéndose la convalecencia al quinceavo día.

Hauduroy y Arsimoles, han tratado también un síndrome disenteriforme, producido por el bacilo de Eberth; obteniendo la desaparición de los bacilos y la curación muy rápida. Charles Richet, Azerad y Delarue han obtenido también buenos resultados. J. S. Smith ha tratado siete enfermos y ha observado la desaparición de los bacilos y la convalecencia en cuatro o cinco días.

H. Grenet e Isaac Georges han aplicado el bacteriófago en siete enfermos obteniendo: un resultado netamente favorable, cinco dudosos y un fracaso. Esos autores refieren lo sucedido con un paciente que ingresó al servicio del doctor L. Ramón en estado tífico. A los dos días, la fiebre comenzó a descender y llegó a la normal al sexto día. A su entrada al hospital, se le practicó un hemocultivo y una serorreacción de Widal, siendo ambas negativas; un segundo hemocultivo hecho cinco días después, no dió tampoco ningún dato, pero en esa fecha se puso de manifiesto en los excrementos, un bacteriófago activísimo contra el bacilo de Eberth. Quince días más tarde, el serodiagnóstico daba una aglutinación de uno por ciento cincuenta.

Esto viene a probar lo que antes consignáramos en el capítulo de inmunidad, referente a que el bacteriófago no es ajeno a la naturaleza abortiva de ciertas tifoideas.

Total, que en esta afección, las aplicaciones terapéuticas del bacteriófago son muy irregulares, observándose un elevado porcentaje de casos en que la medicación es ineficaz. Más adelante nos ocuparemos de cómo se explican los investigadores estos fracasos.

Infecciones Colibacilares.—Los primeros ensayos terapéuticos, fueron practicados por Berckrich y Hauduroy y confirmados por Courcoux, Philibert, Sempe y Pereyra.

Los primeros autores publicaron once observaciones de enfermedades urinarias de origen colibacilar, contando nueve éxitos y dos fracasos. Una de estas observaciones se resume así: Cistitis crónica, fracaso del tratamiento médico, curación clínica y bacteriológica obtenida a los siete

días, mediante dos inyecciones de bacteriófago. Después, Hauduroy ha tratado un gran número de afecciones de esta naturaleza con muy buenos resultados y según su parecer las pielonefritis del embarazo son particularmente bien influenciadas con el bacteriófago.

Por último Grenet y Georges han tratado doce casos de colibacilosis urinaria, obteniendo once éxitos y un sólo fracaso. De lo dicho se comprende, cómo el bacteriófago viene a ser legitimado como un agente que nos permite luchar en forma ventajosa, contra las infecciones urinarias colibacilares.

Infecciones por el Estafilococo.—Brunyoghe y Maisin han hecho por primera vez el tratamiento de diez enfermos atacados de furúnculos y han obtenido como resultado, su desaparición en muy pocos días sin ninguna reacción particular.

Gratia ha confirmado esos resultados, dando a conocer una estadística que comprende cincuenta casos de infecciones diversas producidas por el estafilococo y que fueron curadas sin que apareciera ninguna recidiva en el lapso de seis meses.

Barbossa, ha curado estiomielitis crónicas, heridas infectadas e infecciones urinarias. Peyre, Mouret y Gougerot han obtenido también excelentes comprobaciones. Grenet y Georges hablando de su experiencia personal dicen “el bacteriófago se ha mostrado como el tratamiento ideal de la furunculosis y por lo tanto creemos que merece ser generalizado.”

Por último, el profesor Andrés Raiga, publica en la Presse Medicale del 9 de febrero del año en curso, un artículo acerca del tratamiento de la furunculosis por el bacteriófago; habiendo obtenido un noventa y cinco por ciento de casos en que se manifestó una acción favorable inmediata. Dice este autor haber tratado con éxito panadizo, abscesos y flegmones, reservándose la publicación detallada de estos casos para más adelante.

Posología.

El bacteriófago debe suministrarse simultáneamente por vía bucal y por vía subcutánea, advirtiéndose y esto es muy importante, que cuando haya posibilidad se ponga en contacto directo con el foco supuratorio.

Por vía bucal se suministrarán de diez a veinte c. c. de bacteriófago puro o diluido en agua ordinaria, para tomar durante el día y fuera de las comidas, en cuatro o cinco porciones.

Por vía hipodérmica, dos inyecciones de tres a cuatro c. c. cada una, con veinticuatro horas de intervalo.

Las aplicaciones locales, se harán por medio de inyecciones en las cavidades y valiéndose de curación empapada del principio en los sitios accesibles.

Jamás se inyectará el bacteriófago por vía subcutánea más de dos o tres veces, so pena de producir en el organismo la aparición de suero antibacteriófago. La ingestión por el contrario, tiene la ventaja de no sensibilizar, por más que de ella se abuse. Respecto a la duración del tratamiento, podrá prolongarse de cinco a diez semanas.

Reacciones.

Las reacciones que siguen a la administración del bacteriófago son una verdadera excepción y se manifiestan en dos formas que bien podemos llamar local y general.

Consiste la primera en edema, enrojecimiento y ligero dolor al nivel del punto inoculado; síntomas que se inician en las primeras horas, para desaparecer al cabo de unas veinticuatro. Es posible que su presencia obedezca a la sensibilidad particular de algunos sujetos ante las proteínas microbianas, puestas en libertad por el bacteriófago.

La reacción general se reduce a una crisis de sudor, en veces exagerada, pero que no trae consigo ninguna complicación. A la inversa de la anterior, solo aparece en los sujetos enfermos y traduce probablemente la destrucción microbiana llevada a término en el organismo. Ninguna de estas formas contraindica el empleo del bacteriófago ni entraña peligro alguno.

Fracasos de la Bacteriófago-Terapia.

A varias causas han achacado los autores la ineficacia observada en algunos casos de tratamiento por el bacteriófago.

Para su mejor estudio las agruparemos de la manera siguiente: fracaso debido a que el microbio infectante no es lisible por el principio empleado; a cronicidad de la infec-

ción; a que el agente aislado no sea el que realmente produce la enfermedad, a la administración de un medicamento intempestivo, y a la presencia de antífagos en el suero del sujeto tratado. Por último, nos ocuparemos del caso particular de la fiebre tifoidea.

(a) El caso típico de fracaso por que el germen no sea lisible por el bacteriófago empleado, lo tenemos en la experiencia de D'Herelle con la tifosis aviaria. De modo que siempre que se vaya a realizar un tratamiento, hay que tener la precaución de hacer una prueba in vitro. Si la lisis se lleva a término, puede aplicarse; en el caso contrario, habrá que preparar un autobacteriófago lo que por desgracia requiere tiempo; de ahí que el ideal, consista en poseer principios lo más polivalente posible, logrando así que muy escasos gérmenes les ofrezcan resistencia.

Puede suceder también, que el germen infectante varíe de un día a otro, lo que explica que algunas veces, a pesar de la lisis efectuada in vitro, la ineficacia in vivo sea absoluta. En estos casos, hay que hacer un estudio delicado de la infección desde el punto de vista bacteriológico y someter a prueba todos los gérmenes aislados.

Lo que siempre hemos de tener presente es que: aplicar a una enfermedad un bacteriófago que no lisa el microbio patógeno in vitro, es ir infaliblemente al fracaso.

(b) Es hecho de general observación, que los gérmenes de las infecciones crónicas son muy difícilmente lisables; de ahí que estos casos deban ser tratados con insistencia, pues la mejoría y curación no sobrevienen sino al cabo de uno o dos meses.

Cabe pensar, si la condición de cronicidad no está supeditada a la resistencia de los gérmenes al bacteriófago, ya que como sabemos, este principio juega un papel muy importante en la curación natural de las enfermedades.

(c) El caso de que el germen aislado no sea el verdadero agente de la infección, explica sin más el fracaso del tratamiento por el bacteriófago.

(d) Hay dos medicamentos incompatibles con el principio bacteriófago: la quinina y la urotropina o sus derivados, ya que anulan por completo sus propiedades líticas.

(e) Recientemente se ha hecho el descubrimiento de sueros poseedores de antífagos, es decir de sueros que impiden la acción del bacteriófago.

Constituye esta particularidad un verdadero obstáculo para el tratamiento, que no tendrá resultado alguno, mien-

tras los antifagos no sean combatidos por la autohemoterapia, que felizmente presta en estos casos ayuda singular.

Refiriéndose a la fiebre tifoidea Hauduroy dice: que la observación de cierto número de casos le ha demostrado la destrucción in vivo del bacilo de Eberth, pero que éste reaparece en seguida, como si se luchara contra un microbio que se renovase continuamente y detrás del cual hubiera "algo" contra lo que no se puede nada. La hipótesis de un ultravirus le viene a la mente, pero como él lo dice, no hay pruebas experimentales absolutas.

¿Ocurrirá en la tifoidea humana lo que en la peste porcina? En esta última, el bacilo suipestifer fué por largo tiempo considerado como el germen causal; se le encuentra en la sangre y en los órganos, inoculado reproduce la infección y se han preparado sueros y vacunas efectivos. Sin embargo, hoy sabemos que el suipestifer no es más que un agente secundario a la infección por un ultravirus.

Si en la tifoidea se comprobara otro tanto, se explicarían los fracasados del bacteriófago en esta afección.

Por último hay en el sentir de Hauduroy, una causa más: estamos empleando un agente terapéutico nuevo, aun no lo sabemos aplicar debidamente. Período de tanteo en que nuestra inexperiencia es motivo de muchos fracasos, es de esperarse que en el futuro, con un mayor dominio sobre el manejo del bacteriófago, los éxitos serán más y más frecuentes.

MANEJO TECNICO DEL BACTERIOFAGO

Aislamiento.

Esta operación está basada en la propiedad que tiene el principio lítico de atravesar los filtros de porcelana.

El instrumental necesario consiste: en un aparato de filtración, ya sea el Martin, el Kitasato o el que expende la casa Gogit; en bujías Chamberland de porcelana correspondientes a los números L-2 y L-3 y por último en un aparato para hacer el vacío provisto, de su respectivo manómetro. Nosotros nos hemos servido del filtro Martin; que no es más que un tubo ancho de vidrio, cerrado en una de sus extremidades que constituye el pie y abierto en la otra. El extremo abierto se obtura herméticamente gracias a un tapón de hule, perforado en su centro por el tallo de un embudo, que va a desembocar en la cavidad de la bujía con la cual se conecta por medio de otro tapón elástico. Al nivel de la parte media del aparato sale un tubo de vidrio de cuatro o cinco centímetros de longitud, al que se adapta la máquina de hacer el vacío. Para filtrar, basta tapar con un poco de algodón el tubo lateral, obturar el aparato después de colocar en su interior la bujía y un tubo que recoja el producto de la filtración, lo cual hecho se someterá todo el dispositivo a la acción del autoclave (120° durante veinte minutos).

La máquina de aspiración se adapta al tubo lateral, se vierte en el embudo aquello que va a filtrarse y se hace un vacío que no pase de veinte m. m. A los pocos minutos, ya se han obtenido algunos centímetros cúbicos de filtrado, que pueden dejarse en el propio tubo o trasladarse con una pipeta de bola estéril a cualquiera otro recipiente.

Técnica de D'Herelle.

Cuando se va a realizar una filtración, pueden ocurrir dos casos, según se trate de elementos líquidos o sólidos.

Si se trata de líquidos lípidos ya sean estériles o nó, se pasarán tal cual, al través de la bujía. Si el líquido en cuestión es turbio, habrá que filtrarlo antes en tierra de infusorios o papel adecuado.

Tratándose de elementos sólidos, hay que dejarlos en incubación durante unas veinticuatro horas en caldo ordinario, con lo cual se logrará una solución homogénea que será sometida a las mismas condiciones que los líquidos turbios.

Con anterioridad se ha preparado un cultivo en gelosa del germen que se quiere destruir. Partiendo de este cultivo se sembrarán cuatro tubos de agua peptonada, el primero servirá de testigo, al segundo se le añadirá una gota de filtrado, veinte al tercero y dos c. c. al cuarto. Se colocan todos a la estufa a 37° y a las doce o diez y ocho horas se podrán leer los resultados.

Tres casos pueden ocurrir:

1.°—Tubo testigo turbio, los demás claros. Bacteriófago muy activo.

2.°—Tubo testigo turbio, los demás mucho menos turbios. Bacteriófago medianamente activo.

3.°—Tubo testigo turbio, los demás de la serie tan turbios como él. Este aspecto no nos autoriza para negar la presencia de bacteriófago y el consejo que da D'Herelle consiste en tomar 1/50 de c. c. de cada uno de los tres cultivos y sembrarlo en tres tubos de gelosa inclinada. Si después de incubación, éstos presentan cultivos normales la investigación se considerará como negativa; en cambio, si aparecen zonas claras y colonias irregulares, la presencia del bacteriófago es innegable. La técnica referida no varía, cualquiera que sea la bacteria que se trate de lisar.

Hauduroy ha modificado el procedimiento de D'Herelle, logrando obtener un método que tiene la ventaja de ser mucho más sensible. En nuestra experiencia personal nos ha dado muy buen resultado y por esta razón no queremos dejar de consignarlo aquí.

Técnica de Hauduroy.

Este autor, siembra el producto sobre el cual se investiga el bacteriófago, en agua peptonada o en caldo corriente y lo somete a la acción de la estufa por espacio de veinticuatro horas, cualquiera que sea su naturaleza. Si el cultivo resulta muy denso, lo pasa antes de filtrar en la bujía, por tierra de infusorios o papel Chardin.

De antemano, ha sembrado en caldo el germen que se trata de someter a lisis, advirtiéndole que no debe tener más de veinticuatro horas en el momento que se haga la experiencia.

Con este cultivo siembra cuatro tubos de caldo o de agua peptonada: el primero sirve de testigo, el segundo, tercero y cuarto serán añadidos con una gota, un c. c. y dos c. c. de filtrado respectivamente, dejándolos después a la temperatura del laboratorio; es decir a unos 20 a 25°.

Tres casos pueden presentarse:

Que los tubos con filtrado estén clarificados—Bacteriófago muy activo.

Que estén medianamente turbios—Bacteriófago poco activo. Y por último que estén completamente turbios. Para poder negar en este caso la presencia de bacteriófago, habrá que recurrir a la técnica de exaltación, que describiremos en seguida.

Este modo de proceder permite hacer evidentes principios líticos que escapan con el sistema ideado por D'Herelle.

Técnica de Exaltación de la Virulencia de un Bacteriófago.

Cuando un filtrado que se ha puesto en contacto con una bacteria, no ha sido capaz de destruirla, debemos pensar que hay bacteriófago, pero no lo bastante virulento para producir el fenómeno.

Por un procedimiento bastante sencillo, se logra conceder activa virulencia, a un principio que la poseía en débil grado. Basta para ello, filtrar la mezcla bacterias más filtrado que permaneció turbia y agregarla en dosis de uno o dos c. c. a una serie de tubos, en los cuales se ha sembrado una gota de cultivo reciente del bacilo que se trata de lisar. En caso que la turbidez persista, hay que volver a practicar la operación, por tres, cuatro o diez veces si es necesario. Si a pesar de esto, la lisis no se realiza, podemos concluir o que no hay bacteriófago en el producto examinado o que la bacteria en cuestión es resistente.

Por el procedimiento indicado, se ponen de manifiesto bacteriófagos que por su escasa virulencia habían permanecido inadvertidos y ello por lo general al segundo o tercer filtrado, siendo de observarse que la virulencia acrece a medida que se repite la operación. Para terminar, diremos que hay una virulencia límite para cada bacteriófago, la cual no se puede sobrepasar.

Técnica de Aumento de la Polivalencia de un Bacteriófago.

Hay posibilidad de adaptar un bacteriófago a destruir gérmenes que primitivamente le resistían. Ello se consigue enfrentando el principio con el agente en cuestión y filtrando en seguida, repitiéndose la maniobra por un cierto número de veces hasta que la lisis se verifique. La posesión de bacteriófagos polivalentes, es de gran utilidad para los usos terapéuticos.

Técnica de Numeración del Bacteriófago.

Dos sistemas hay, para contar los elementos bacteriófagos: el de D'Herelle y el de Appelmans.

El primero, está basado en que las zonas claras constituyen colonias aisladas del principio bacteriófago. Tiene el inconveniente de que en algunas circunstancias es sumamente difícil el recuento de las mencionadas zonas. Puede ocurrir también que sean confluentes, en cuyo caso se cometen errores considerables en una operación que de por sí, está muy lejos de ser precisa.

La técnica de Appelmans está basada en las diluciones y se lleva a término en la forma siguiente: se prepara una serie de tubos con diez c. c. de emulsión de bacilo Shiga; se introduce en el primer tubo un centésimo de c. c. de bacteriófago, un c. c. del primer tubo en el segundo, un c. c. del segundo en el tercero y así sucesivamente.

Si la lisis se lleva a cabo desde el primero hasta en el quinto tubo, hay que recurrir a este cálculo: Del primer tubo al segundo se ha transportado un milésimo de c. c. de principio es decir $1/100$ repartido en diez c. c. Del segundo al tercero $1/10.000$, del tercero al cuarto $1/100.000$, del cuarto al quinto $1/1.000.000$ de c. c. es decir que un solo elemento bacteriófago quedaba en el último tubo. El bacteriófago que se deseaba titular, contiene un millón de microbios por c. c.

Técnica de Preparación de un Bacteriófago

Para la preparación de un bacteriófago como agente terapéutico, hay que rodearse de toda clase de garantías, sin las cuales es del todo imposible conseguir este objeto. Antes de principiar todo preparado, deberá hacerse el diagnóstico bacteriológico de la infección, así como el ais-

lamiento del germen patógeno. Esto logrado se le pondrá en presencia de bacteriófagos probados de antemano. Si la lisis se lleva a efecto se puede administrar el principio tal cual; en el caso contrario habrá que exaltar su virulencia hasta que su acción sea bien neta. Antes de aplicarlo habrá que pasarlo de nuevo por el filtro y cerciorarse de su completa esterilidad, para lo cual se le debe dejar por espacio de tres o cuatro días en la estufa a 37° .

Para llevar a cabo con éxito todas las técnicas que hemos mencionado, es indispensable tomar algunas precauciones, como son: la alcalinidad del medio, la regeneración de las bujías usadas, la rapidez en la filtración que no debe pasar de diez minutos y la presión que no debe exceder de 20 m. m. Esta es la única forma de llegar a obtener resultados satisfactorios.

EXPERIENCIAS PERSONALES

El manejo del bacteriófago, como su aislamiento, reclaman técnicas que difieren grandemente de las usadas en la práctica bacteriológica. Se trata de un sér vivo cuya presencia no se traduce, si no por la destrucción de los distintos gérmenes; de su aislamiento; numeración; exaltación de virulencia, etc. Esto a más de nuestra inexperiencia, motivó que surgieran en el curso de la tarea dificultades sin cuento, que no pudimos vencer, sino con mucho tesón. Repetidas veces, fueron detalles aparentemente banales, pero que falseaban del todo el resultado final. Queremos insistir en algunos puntos esenciales que nuestra escasa práctica nos ha enseñado. Entre otros: la aplicación de la técnica de Hauduroy para el aislamiento del principio y el empleo de medios correctamente preparados. En varias ocasiones, la técnica mencionada fué recurso precioso que nos permitió poner de manifiesto bacteriófagos, que con la técnica de D'Herelle no habíamos logrado encontrar; y en lo que se refiere a la calidad del caldo, tuvimos la oportunidad de observar que cuando era ligeramente ácido, el fenómeno no se llevó a cabo.

Iniciamos la investigación del principio bacteriófago, en la pulpa de vacuna preparada por el Instituto Nacional, sin haber logrado poner en evidencia ni colífago ni estafilófago.

Después, nos ocupamos del aislamiento en las materias fecales de conejo y de cuyo, sin encontrar ninguno de los principios precitados. El producto de filtración de estos excrementos, fué puesto también en contacto con bacilos de los grupos para A y para B, siempre con idénticos resultados.

El 12 de marzo de 1929 practicamos el filtrado de las materias fecales de un niño completamente sano, que contaba nueve meses de edad. Al mismo tiempo hicimos el aislamiento del bacilo Coli, tomado de sus excrementos. Habiendo comprobado por las diversas reacciones específicas, que poseíamos cultivos puros del gérmen en cuestión, lo enfrentamos con el producto filtrado, valiéndonos del procedimiento de Hauduroy. Es decir, que partiendo de

un cultivo de 24 horas de bacilo Coli, sembramos cuatro tubos de caldo: el primero quedó como testigo de la experiencia, al segundo le agregamos una gota de filtrado, al tercero veinte y 2 c. c. al cuarto. Los dejamos a la temperatura del laboratorio y a las 24 horas el cuadro que tuvimos a la vista era el siguiente: tubo testigo completamente turbio, los demás de la serie completamente clarificados (Véase fotografía N° 1). La microscopía del segundo tubo, nos permitió observar que contenía colibacilos completamente atípicos; formas de estreptobacilos y bacilos larguísimos abundaban en su contenido. El cuarto tubo en cambio estaba completamente estéril. Con la mira de observar el fenómeno en medio sólido, sembramos dos tubos de agar, con bacilo Coli más bacteriófago y a las 24 horas se manifestaron las colonias con sus zonas claras, es decir desprovistas de cultivo y con sus bordes absolutamente irregulares (Véase figura N° 2). Comprobamos en seguida la lisis en serie y obtuvimos excelentes resultados.

Es pues, innegable, que habíamos aislado un colífago, del intestino normal de un niño sano.

El segundo bacteriófago fué aislado de un individuo que padecía de cistitis crónica de origen calculoso desde hacía seis meses.

Se manifestó ser activo con marcada virulencia, ante el bacilo Coli.

Por último, las cualidades antisépticas atribuidas a la saliva, dieron lugar a que pensáramos que el principio bacteriófago estuviera en ella presente. Durante 24 horas dejamos incubar unos cuantos c. c. de esta secreción tomados de una persona sana y practicamos la filtración, enfrenando el producto con distintos gérmenes. Manifestó en la serie de bacilo Coli una potentísima actividad, ocasionando la lisis aún con una sola gota.

Es de advertir, que el mismo filtrado sin incubación previa, no produjo la aclaración de los cultivos.

El hallazgo referido nos parece importante, ya que explica la rápida cicatrización de las soluciones de continuidad de la mucosa bucal; la rareza de supuraciones a este nivel; la posibilidad de comunicaciones entre la boca y los senos maxilares sin mayores consecuencias y que justifica talvez la creencia popular de que la saliva ejerce una acción curativa sobre ciertas infecciones (orzuelo). Habríamos querido investigar la presencia del bacteriófago en otros productos y humores (secreción nasal, lagrimal, sudor, etc.), pero la escasez de tiempo no lo permitió.

Nos anima el más vehemente anhelo de continuar estos estudios; los que proseguiremos siempre con igual entusiasmo, ocupándonos especialmente de la cuestión terapéutica aplicada, que sin duda alguna redundará en beneficios inmensos para aquellos que sufren la inclemencia de ciertas enfermedades.

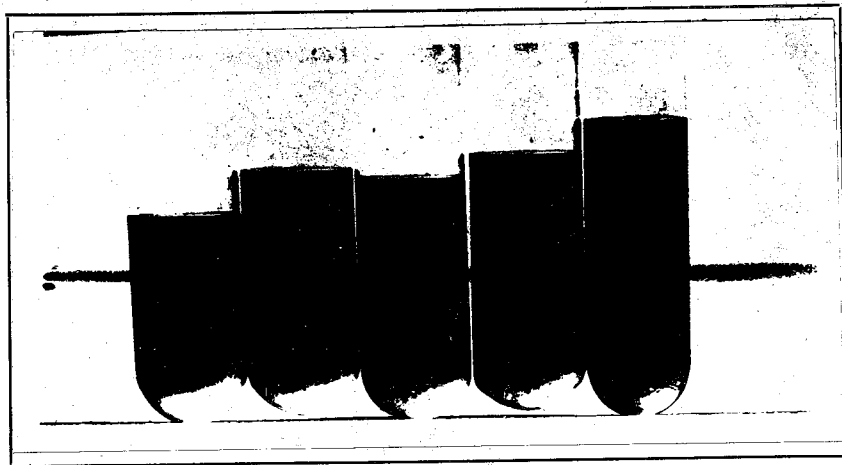
FERNANDO BIGURIA S.

Vº Bº

R. MORALES.

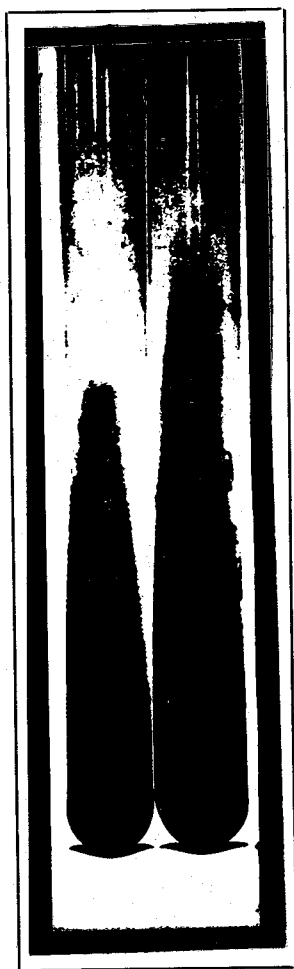
Imprimase,

JUAN J. ORTEGA.



FOTOGRAFIA N° 1.

El Fenómeno de D'Herelle en medio líquido (caldo). La línea oscura detrás de los tubos, permite apreciar la turbidez del tubo testigo y la transparencia de los cultivos lisados.



FOTOGRAFIA N° 2.

El Fenómeno de D'Herelle en medio sólido (agar) Nótese las zonas claras y los bordes irregulares de la colonia.

BIBLIOGRAFIA

Le Bacteriophage et son Comportement, por *F. D'Herelle*.

Le Bacteriophage de D'Herelle, por *Paul Hauduroy*.

Le Principe Bacteriophage (Phenomene de D'Herelle)., por *M. Andre Philibert*.

Immunisation Locale, por *A. Besredka*.

La Presse Medicale 1° de Agosto de 1928.

El Cólera Asiático, por *F. D'Herelle*.

La Presse Medicale 29 de Agosto de 1928.

Algunos ensayos Terapéuticos con el Bacteriófago de D'Herelle, por *H. Grenet y P. Isaac Georges*.

La Presse Medicale 9 de Febrero de 1929.

Tratamiento de los furúnculos y del antrax por el Bacteriófago de D'Herelle, por *Andre Raiga*.

PROPOSICIONES

<i>Anatomía Descriptiva</i>	Estómago.
<i>Anatomía Patológica</i>	De la Ataxia Locomotriz.
<i>Botánica Médica</i>	Cornezuelo de Centeno.
<i>Clínica Quirúrgica</i>	Lavado vesical.
<i>Clínica Médica</i>	Permeabilidad renal.
<i>Fisiología</i>	Del estómago.
<i>Farmacología</i>	Supositorios.
<i>Física Médica</i>	Estufa de Foot.
<i>Ginecología</i>	Cáncer del cuello del útero.
<i>Higiene</i>	Profilaxis de la tifoidea.
<i>Histología</i>	Tejido epitelial.
<i>Medicina Legal</i>	Psicoanálisis.
<i>Obstetricia</i>	Hidramnios.
<i>Patología General</i>	Inmunidad.
<i>Patología Externa</i>	Furunculosis.
<i>Patología Interna</i>	Peritonitis.
<i>Química Médica</i>	Oxígeno.
<i>Terapéutica</i>	Ergotina.
<i>Toxicología</i>	Intoxicación por el ácido H Cl.
<i>Zoología Médica</i>	Phlebotomus papatacci.