

Experimentación con *Bacillus anthracis*

Por el Dr. Omar Viera

(Conferencia correspondiente al ciclo de divulgación científica para médicos y estudiantes de los cursos superiores de Medicina, dictada en el Instituto de Higiene Experimental de Montevideo en el año 1940).

Teniendo en cuenta el carácter de divulgación de estas disertaciones, daré a conocer en el curso de ésta, algunos hechos salientes de la experimentación con *Bacillus anthracis*, que, aunque conocidos, no están consignados explícitamente en los libros didácticos, y que se refieren especialmente a composición antigénica, variaciones, al aspecto serológico e inmunológico y algo referente a la infección experimental y natural y a la patogenia del carbunco.

Las investigaciones acerca de la composición antigénica del bacilo del carbunco comienzan a intensificarse a partir del año 1921, en que Kramar dice haber extraído de este germen una sustancia con los caracteres de las glicoproteínas y que supuso una pseudo-mucina; en 1929, Combiesco, Soru y Stamatesco logran demostrar la presencia de una sustancia hidrocarbonada en la composición del *B. anthracis*; el mismo año Shockart extrae una sustancia similar; del 1929 al 1934 otros investigadores, Tomcsik, Tomcsik y Szongott, Tomcsik y Bodon, y Sordelli Deulofeu y Ferrari, encuentran estas mismas sustancias. Es especialmente Tomcsik y colaboradores quienes llegan a discriminar la distinta naturaleza química entre sustancia de la cápsula y sustancia somática, demostrando que la sustancia capsular es, además, una proteína distinta de los nucleoproteídos del cuerpo del bacilo. Un impulso mayor hacia este conocimiento dieron algunos colaboradores de Tomcsik entre los cuales cabe destacar a Ivanovics.

Ivanovics y Erdös aíslan de la cápsula del bacillus *Anthraxis* un hápten de naturaleza ácida y que no contiene hidratos de carbono, como ya lo habían demostrado Tomcsik y Szongott. Esta sustancia no posee los caracteres de las proteínas y una solución al 0.5 % da la reacción azul del rojo Congo y no da la reacción de Molisch. Se trata de un ácido coloidal que se puede obtener como sal de sodio o al estado de ácido libre, tal como ya lo habían observado también, Tomcsik y Szongott. Por

hidrólisis clorhídrica este hápten pierde su actividad aumentado su tenor en nitrógeno libre.

Además, estos investigadores, encontraron que este hápten es común a varias especies semejantes al *Basillus anthracis*, tales como los del grupo *Subtilis*, *Mesentericus*, etc., del punto de vista químico y serológico.

En colaboración con Bruckner, Ivanovics progresa en las investigaciones sobre la naturaleza de la sustancia "P" (que así fué denominada la sustancia capsular, reservándose la denominación de sustancia "C" al componente somático) y logra demostrar por medio de finas operaciones, que el elemento principal del hápten capsular era el ácido l-glutámico y que el complejo químico y antigénico de la cápsula del *B. anthracis* está constituido por un polipéptico de un sólo ácido aminado. La sustancia "C" es una sustancia de naturaleza hidrocarbonada que es estrictamente específica, dá la reacción de Molisch y reacción de las osazonas (Ionesco; Soru y Wissner).

Como consecuencia de los trabajos anteriores, Schaefer y Sandor, operando con *B. anthracis* virulentos y cepas de vacunas del tipo pasteuriano, obtienen en ambas, las dos sustancias y observan que las variantes de estas cepas que han perdido su poder capsulígeno, no contienen más que el hápten somático y confirman además, la identidad del hápten capsular del *B. anthracis* con el correspondiente de algunas variedades mucoides del grupo *meseutericus* y *subtilis*. Los mismos investigadores utilizando las técnicas de Tomcsik, Szongott, y de Ivanovics y Erdös preparan los antígenos del bacilo del carbunco y observan la gran actividad de la sustancia capsular en su función antigénica; la reacción de Ascoli dá anillo visible aún a la dilución de 1/100.000.000 del suero anticapsular; la dilución del antígeno dá reacción aún a la dilución de 1/10.000.000 (reacción de floculación por mezcla del antígeno y del antisuero con lectura al día siguiente). La actividad del antígeno somático (polisacárido) es mucho más débil: 1 en 100.000 tanto en la reacción de Ascoli como en la mezcla floculante.

En la reacción de fijación del complemento el suero antiosmático diluido al 1/10 dá la fijación completa hasta 1/160.000 e incompleta hasta el 1/640.000. El antígeno capsular no fija el complemento sino a la dilución de 1/10.000. La especificidad de aglutinación del suero anticapsular es muy pronunciada (con *B. anthracis*), siendo altamente precipitante para los extractos de los antracoides *Mesentericus* y *Subtilis*; no los aglutina en cambio, como lo hace con el *B. anthracis*. Por lo demás, los antisueros de estos antracoides no aglutinan *B. anthracis*, precipitando sus extractos. El suero anticapsular siendo indiferente frente a las cepas no capsulígenas, se presta a diferenciar éstas de las capsulígenas.

Ivanovics y Bruckner (1938) prosiguiendo sus investigaciones químicas e inmunológicas sobre *B. anthracis* encuentran que, acoplado proteínas diversas a la sustancia capsular (Hápten) el complejo se muestra

antigénico en el animal. Preparan en conejo suero anti ácido l-glutámico + azoproteína de caballo y estudian por precipitación este suero frente a diversos azo-antígenos difiriendo entre ellos por el grupo proteico o por el grupo ácido-aminado; las mismas reacciones son estudiadas con los azotantígenos frente a un suero anti "P" y también este suero absorbido por los azo-antígenos o por la sustancia "P". Los resultados confirman la especificidad de los azo-antígenos bacterianos y de sus anticuerpos homólogos. (Ivanovics y Bruckner. Zeitschr. f. Immunität T. 93, pág. 119 - 136 - 1938).

Posteriormente a este ensayo, Tomcsik e Ivanovics, ensayan la preparación de anticuerpos anticapsulares, inoculando a conejos por vía venosa, grandes dosis de bacilos anthracis capsulados y muertos por el calor. Operan con gran cantidad de conejos (214), pues mueren muchos en el comienzo de las inoculaciones. La sustancia capsular es tóxica, como lo demuestra este ensayo y la experiencia de Robyn que, inoculando por vía peritoneal al cobayo una cepa del bacilo del carbunco atenuada que solo mata al ratón, pero que capsulada in vitro, mata al cobayo cuando es inoculada a grandes dosis por el peritoneo, donde se produce una lisis rápida de los microbios y una absorción de la sustancia capsular; ésta es demostrable en los órganos y en la sangre del corazón con reacciones apropiadas o por coloración con el azul de toluidina.

Estos experimentadores observan que al comienzo de la inmunización son los anticuerpos anti "C" los primeros que aparecen; después estos desaparecen poco a poco, quedando solamente los anti "P". Llamam la atención de que es necesario utilizar cultivos no autolisados, pues la sustancia "P" no es antígeno "in vivo" más que bajo la forma "ligada"; en el autolisado no es más que hápten. Con referencia a este punto, nosotros hemos hecho ensayos sin conocer los trabajos de estos autores que concuerdan en general con los mismos: observando que las cepas atenuadas del B. anthracis, capsuladas "in vitro", inmunizaban muy bien al cobayo, se nos ocurrió utilizar como antígeno inmunizante en estos animales el lisado por envejecimiento, de cultivos en caldo-suero. Este lisado fué inoculado a seis cobayos, (murió uno de este lote por estreptococia) después de capsulada "in vitro". La misma cepa después de capsulada "in vitro" fué inoculada igual al N.º de cobayos. El resultado fué que, resistieron el virus de prueba (10 dosis m. m.) estos últimos, muriendo los primeros y los seis testigos.

La sustancia capsular obtenida de los cultivos ha sido identificada desde el punto de vista serológico (Tomcsik y Bodon), con el antígeno capsular, librado en el organismo por el B. anthracis en los casos de infección natural o experimental. Se empleó para ello el suero obtenido en conejos con cepas capsuladas de cultivo y se pudo hacer comparativamente la demostración usando suero anti "C" (suero antipollósido somático) que en el organismo el antígeno "P" está en proporción enormemente superior al antígeno "C".

Desde el punto de vista de la eficacia del suero anticarbuncloso y como complemento de estos trabajos referidos, se estudió el valor de ese suero especialmente en lo que atañe a la acción preventiva. En 1934, Tomcsik y colaboradores, investigan sueros anticarbuncloso del comercio y encuentran que la mayoría de ellos estaban constituidos solamente por anticuerpos antipolisacáridos y que poseían poco o ningún valor preventivo. En 1938 como conclusión definitiva de sus observaciones, dice: "que los sueros anticapsulares (hechos con cepas capsuladas) protegen bien al ratón contra la infección carbunclosa, mientras que los sueros antisemáticos (hechos con cepas no capsuladas), no poseen ninguna acción protectora. Los sueros anticarbuncloso obtenidos en caballos y que no contengan anticuerpos anticapsulares, son inactivos. La saturación de los sueros anticarbuncloso conteniendo anticuerpos anticapsulares, por el hápten homólogo, priva a estos de su poder protector". Aconseja este autor, de modo muy especial, hacer los sueros y las vacunas contra el carbunco con cepas capsuladas.

Variaciones en *B. anthracis* (1).

La colonia normal, típica, del *B. anthracis* se rugosa (tipo "R"); en cultivos sucesivos por disociación se pueden obtener colonias lisas (tipo "S") menos virulentas que las "R" típicas. A partir de las colonias "S", mucoides, que están en general constituidas por microbios capsulógenos, por disociación, se pueden obtener colonias "R" virulentas y "R" atenuadas y a veces avirulentas que han perdido la facultad de formar cápsula. Los primeros trabajos sobre variaciones datan del año 1915, en que Bail, calentando durante cuatro horas a 48°, un cultivo de una cepa virulenta de *B. anthracis*, obtuvo, cultivando en suero después, variantes que se encapsulan y otras que no; una de estas últimas, después de 25 pasajes en suero, provocaba edema y muerte en el ratón. Después de la muerte se observaba que los bacilos del edema, no poseían cápsula y en los órganos y en la sangre no se observaban lesiones aparentes, ni bacilos.

Sterne (1937) hace experimentos muy interesantes sobre variación de colonias y virulencia del *B. anthracis*. Operando con colonias mucoides "S" las atenúa a 42° y obtiene por disociación de éstas, variantes "R" que eran menos virulentas que las variantes "S" de que derivaban; que en algunos casos esas variantes "R" eran completamente avirulentas.

La pérdida de la virulencia y del carácter "S" iba a la par con la aptitud a formar cápsula, tanto "in vivo" como "in vitro". Algunas de estas variantes "R", las que no habían perdido por completo la virulencia, conservaban el poder de inmunizar al cobayo.

(1) Desde el punto de vista morfológico el *B. anthracis* constituye una excepción en cuanto a relación de forma de colonia y virulencia: en general las colonias "R" son poco virulentas en las bacterias patógenas y las "S" son virulentas; en carbunco las "R" normales son las virulentas y las "S" las atenuadas.

El mismo investigador, trabajando con cepas virulentas recientemente aisladas, obtuvo por disociación en gelosa suero y en atmósfera de ácido carbónico, variantes mucoides "S". Esta variante, dió en las mismas condiciones, colonias hijas tipo "R", tal como acontecía con las cepas atenuadas. Algunas de estas variantes "R" eran completamente avirulentas y no daban cápsula, siendo otras capaces de inmunizar al cobayo y, del ensayo de inmunidad en ovinos y caprinos, obtuvo resultados, aunque no concluyentes, alentadores. Observa el autor la facultad edematógena de algunas de estas variantes "R" no capsulógenas. Sin embargo, concluye Sterne, existe correlación estrecha entre la cápsula, la virulencia y el grado de inmunidad anticarbunclosa.

Stamatin (1938) obtiene cepas edematógenas y no capsulógenas tipo "R", de poca virulencia, a partir de variantes mucoides "S" de cepas virulentas que previamente habían sido cultivadas en sangre desfibrinada de caballo. Obtiene con ellas un buen grado de inmunidad en animales de laboratorio y en ovinos. Sostiene que estas cepas no tienen carácter invasor, como las capsulógenas que inoculadas a animales de laboratorio dan ligera reacción local que pronto desaparece, pero que estos animales pueden morir tardíamente (10 a 12 días) después de la inoculación.

Nosotros hemos observado muertes tardías en cobayos inoculados con cepas atenuadas experimentalmente, cepas tipo "Sm" capsulógenas de los 14 a 17 días después de la inoculación. (Nos referiremos más adelante a este hecho y sobre la necesidad de inyectar estas cepas con una sustancia de acción irritante local = sustancias "adyuvantes" o "estimulantes no específicas" en la terminología de Ramón), cuando se pretenda inmunizar animales de laboratorio y aún animales de campo.

Vamos a referir un hecho observado por nosotros en punto a variación del B. anthracis, que es el siguiente: tratando de hipercapsular "in vitro" cepas atenuadas por nosotros (cepas mucoides), que sólo matan al ratón y excepcionalmente algún cobayo cuando se les inocula con la forma miceliana; utilizando un medio líquido constituido de caldo simple fermentado y suero de caballo, hemos observado que cuando en ese medio se ven esporos, es siempre en algunos elementos capsulados. Es precisamente en aquellos elementos que poseen mayor cápsula, a veces cápsulas gigantes, en donde se observa la esporulación. En este estado, calentando el cultivo a una temperatura que destruya solamente los elementos micelianos, se obtiene un cultivo de esta cepa mucóide "S" que tiene más virulencia para los animales de laboratorio que el cultivo integral repicado antes de calentar. Como corolario de esta observación, observamos que los esporos una vez obtenidos en medios apropiados conservaban la facultad capsulógena "in vivo" e "in vitro". Llegamos a la conclusión de que esta facultad, si bien es mantenida por un tiempo, va perdiéndose gradualmente, lo que se observa por el decreciente número de individuos que capsulan en primo-cultivo en caldo suero y por la

disminución de la capacidad inmunizante para el cobayo. Otro hecho interesante correlacionado con los anteriores, es el que, los esporos de las cepas atenuadas, mucho menos resistentes al calor que los de las cepas virulentas, readquieren una resistencia intermedia, que decae también, a medida que decrece la facultad capsulígena.

Prosiguiendo con la exposición del resumen de los trabajos sobre variaciones del *B. anthracis* mencionaremos uno de Takahasi sobre disociación a partir de un solo germen. T. emplea la técnica de la micromanipulación y obtiene una serie de cultivos a partir de gérmenes únicos, aislados de un cultivo de laboratorio o de sub-cultivos unicelulares. Concluye que la disociación microbiana no es debida por lo tanto, a la heterogeneidad de la cepa original, sino, a cualidades de la plástida microbiana que están sujetas a modificaciones reversibles o irreversibles.

Estas modificaciones, se traducirían por propiedades diferentes, que interesarían más particularmente a la capsulogénesis y a la virulencia.

De los trabajos mencionados, referentes a composición antigénica y variación del *B. anthracis*, hemos visto, especialmente por los de Stamatin y los de Sterne, que es posible por disociación, obtener, a partir de cepas virulentas o atenuadas, cepas mucoides "S", que a su vez darían cepas "R" con cierta virulencia que pueden inmunizar y cepas "R" avirulentas que son incapaces de inmunizar. Siendo indiscutible que las cepas atenuadas del tipo "Sm" dan una buena inmunidad y que el suero obtenido por ellas tiene gran valor protector, no debemos dejar de hacer resaltar que las cepas "R" edematógenas (Sterne. Stamatin) poseen, aunque en menor grado, esta misma propiedad.

Parecería significar entonces, que no solamente por poseer el antígeno capsular, se obtendrían estas propiedades biológicas, puesto que hay cepas no capsulígenas que pueden inmunizar dando sueros protectores y producir agresinas.

Schaefer y Stamatin probaron que se puede obtener un buen suero con cepas no capsulígenas pero edematógenas; Stamatin y Stamatin, pudieron inmunizar activamente con el exudado seroso del edema inflamatorio provocado con una de estas cepas, demostrando por lo tanto que no hay relación directa entre las agresinas de Bail y la cápsula.

Inferimos por estas observaciones que existen cepas de *B. anthracis*, con capacidad inmunizante a pesar de la falta de capacidad capsulígena. Imaginaríamos, a manera de hipótesis, que el poder inmunizante de estas cepas radique en un factor somático quizá semejante al factor "Vi" presente en otros grupos de bacterias patógenas, tales como Salmonelas, Pasteurelas, etc.

Creemos que sería de todo punto de vista muy interesante, tentar de animalizar y de exaltar la virulencia de estas cepas por pasajes en animales receptivos o la, por decir así, animalización "in vitro", para estudiar las modificaciones somáticas y serológicas.

Las cepas capsulógenas, que necesitan para mostrar su cápsula, estos procesos de animalización, cuando se las cultiva en medios simples no acusan el más mínimo rudimento de cápsula. Es evidente que va en la bacteria una propiedad de formar cápsula cuya condición específica del punto de vista antigénico no debe depender exclusivamente de la incorporación de la albúmina del medio, sino de la intervención de un factor somático, un pre-antígeno (llamemósle así) que en las cepas capsulógenas tendría la propiedad de esbozarse en la superficie de la bacteria y que en las cepas no capsulógenas, por circunstancias desconocidas, se mantendría como un factor rudimentario somático, pero interviniendo en la función antigénica inmunizante.

Hemos hablado de animalización y es necesario dar una somera explicación sobre este fenómeno: fué Bail quien denominó así a los microbios que acostumbrados a los cultivos y modificados en parte, recobran sus cualidades naturales cuando se los inocula a los animales receptivos. Fué especialmente con *B. anthracis* que este investigador estudió este fenómeno observando así que el gérmen readquiere en el proceso mencionado su capacidad natural de virulencia, de resistencia a distintos factores, poder antigénico, etc., evidenciando a veces cambios morfológicos: el *B. anthracis* se hace más rechoncho, más grueso y readquiere su cápsula. Estas características las pueden readquirir "in vitro" algunos microbios cuando se les cultiva en medios ricos en albúmina, por ejemplo, en suero. El bacilo del carbunco especialmente, en estas condiciones, adquiere las mismas características que el de pasaje por animales receptivos; de aquí que por extensión se denomine a este procedimiento "animalización in vitro".

En cuanto a la posibilidad de pérdida y recuperación de las características de animalización en cepas recién aisladas, hemos visto que es muy variable: unas las pierden de manera gradual y otras, rápidamente.

Vamos a referir un ensayo de preparación de suero anticarbuncloso en caballos con una de estas cepas que había disminuido enormemente su capacidad capsulógena manteniendo un alto grado de virulencia:

Sosteníamos la creencia de que esta cepa inoculada a animales de laboratorio, iba a recuperar rápidamente sus propiedades perdidas, especialmente la capsulogenesis y que, usada como antígeno, nos iba a proporcionar un suero de alto valor: sin embargo no fué así. Poniéndonos en condiciones óptimas del punto de vista de usar un *B. anthracis* animalizado, inoculábamos al caballo los extractos de órganos de animales inoculados con esta cepa. De paso, habíamos observado que la capacidad de formar cápsulas, era mínima. Con la misma cepa inoculábamos a otro caballo, sin previamente animalizarla. El valor de los sueros obtenidos después de muchas inoculaciones, no acusaba tanto del punto de vista de la acción precipitante, como de la de protección, una mayor diferencia entre los dos, ni una gran actividad.

Es razonable deducir, que no todas las cepas, aún capsulógenas en

pequeño grado como ésta, y de gran virulencia, adquieren, en el proceso de la animalización las cualidades convenientes y necesarias, para la obtención de un buen suero anticarbuncloso.

En cambio, aún con cepas de vacunas anticarbunclosas capsuladas in vitro, los resultados, por lo menos en pequeños animales, son alentadores.

A este respecto, referíanos ha poco el Prof. Dr. Sordelli, que capsulando las cepas de *B. anthracis*, aún con la vacuna N.º 1 de la doble de Pasteur, se obtenían buenos sueros antiarbunclosos.

Por lo visto en lo que acabamos de decir, la virulencia, haciendo abstracción de otras cualidades del germen del carbunclo, no es una cualidad suficiente por sí sola para obtener un buen suero anticarbuncloso, por lo menos inoculándolo por vía venosa, que fué la utilizada por nosotros.

SOBRE INFECCION Y PATOGENIA DEL CARBUNCLO.

Abandonada la doctrina unívoca de Besredka sobre la sensibilidad de la piel, para la infección carbunclosa, admítase, como efecto de comprobaciones, la infección por todas las vías. Cualquiera haya sido la puerta de entrada del agente del Carbunclo, dándonos tipos clínicos de infección, ya sea como manifestación de carbunclo "externo": (hombre, caballo, cerdo), en los que podríamos decir, se observa el sitio de entrada; ya como carbunclo "interno"; (bóvidos y óvidos) en que en general no se vé la puerta de entrada, existe siempre una lesión observada en la autopsia que en mayor o menor grado, es la más importante: se trata de la esplenitis del carbunclo, lesión que de antiguo fué la que motivó la denominación del Carbunclo en distintas lenguas, con referencia siempre a la alteración del bazo. Desde el punto de vista clínico, las lesiones locales, tanto en el hombre, como en los animales que adquieren el llamado carbunclo "externo", no tienen en general más expresión al comienzo que la de lesión local con poca repercusión. Es solamente después que se ha establecido la lesión del bazo, por una gran pululación de gérmenes en dicho órgano, que el cuadro clínico es más manifiesto. Cuatro horas más o menos antes de la muerte el cuadro se hace aún más intenso como síndrome febril, de excitación o de prostración: ello responde a una bacteriemia repentina e intensa por invasión de gérmenes a partir del bazo.

Es en ese lapso de cuatro horas, más o menos, que se observan las hemorragias entéricas o urinarias. Observando las lesiones después de la muerte notamos el predominio de lesiones recientes de tipo hemorrágico, en serosas, mucosas y parénquimas, caracterizadas por grandes sufusiones, petequias, etc. que tienen el carácter de lesiones establecidas en muy poco tiempo, tal como si se tratara de lesiones consecutivas a una intoxicación violenta.

Tomcsik experimentando en conejos, obtiene en ellos, inmunidad an-

ticarbunclosa de distintos grados, e inoculando virus de prueba consistente en cepas muy virulentas, observa bacteriemias poco intensas, sin mayor repercusión, y comprueba que son a partir del foco del punto de inoculación. De estos animales algunos sobreviven y otros mueren más tarde, con lesiones típicas de carbunco. (No son rarezas los casos de hemocultivo positivo en carbunclos externos del hombre a evolución benigna).

Deduciríamos de estos ensayos, que una bacteriemia inicial en animales infectados natural o experimentalmente cuyo foco de infección es externo, no significaría siempre un pronóstico fatal, puesto que se puede observar que estas bacteriemias son distintas en gravedad de las que suceden a la típica lesión carbunclosa instalada en el bazo.

El autor antes mencionado ha señalado que, por lo menos en un 80 % de los animales infectados con carbunco, la sustancia capsular aparece en la sangre algunas horas antes de la muerte y que ella no es debida a la lisis de los microbios en la sangre; sería originada por una lisis de microbios en el bazo y precedería a la irrupción bacilar en la circulación sanguínea.

Nosotros debemos agregar a esta observación, el hecho corroborante de que en todo animal autopsiado en seguida de la muerte, ya sea de carbunco natural o ya de carbunco experimental, es solamente en el bazo donde encontramos elementos lisados, al punto que muchas veces se encuentran siluetas desvanecidas de elementos bacilares, apenas teñidas. Contrasta este aspecto de los bacilos del bazo con los de la sangre y otros órganos, que se colorean de manera homogénea e intensa. Tomcsik ha podido seguir estas fases sucesivas por exploración periódica de la sangre de animales infectados con carbunco, pudiendo pronosticar con bastante aproximación, el momento de la muerte.

Otros hechos experimentales ilustran y confirman los resultados mencionados sobre patogenia del Carbunco: uno de ellos es el referente a la infección crónica obtenida en las ratas con *B. anthracis*. Es sabido que se puede infectar experimentalmente a la rata obteniendo esta forma clínica, y que al morir ésta, generalmente por encima de cuatro semanas, los episodios son agudos, no difiriendo en ello del carbunco corriente natural o experimental, siendo las lesiones típicas agudas un epifenómeno terminal que reproduce el cuadro de lo que sucede en la infección de un animal muy receptivo.

Otro hecho confirmatorio, es el caso de las muertes tardías de cobayos inoculados con cepas atenuadas que señalábamos antes. En los lotes de seis a diez cobayos inoculados por vía subcutánea con estas cepas, ocurre con frecuencia, que algunos resisten a pesar de un pequeño edema, generalmente hemorrágico; otros, con la misma lesión, mueren a los cuatro o cinco días; otros no presentan lesión local y resisten perfectamente, y otros generalmente los que a veces menos reacción local han presentado, mueren entre 14 y 17 días con una septicemia

carbunclosa con muy pocos microbios en la sangre y órganos, y grandes lesiones hemorrágicas en las mucosas, serosas, parénquimas, etc. Sin embargo, existe algo en la anatomía patológica que nos llama en seguida la atención: el bazo, enormemente aumentado de volumen, de consistencia bastante firme, esponjoso, con reacción hiperplásica del tejido de sostén y de los corpúsculos linfoides; es un bazo distinto al de los animales muertos corrientemente por carbunclo, podríamos decir, una forma sub-aguda de reacción inflamatoria esplénica en el carbunclo.

Si en la autopsia se explora la parte del tejido conjuntivo subcutáneo donde se había efectuado la inyección en estos animales, no se observa, a veces, ni vestigios de reacción.

Ensayando cepas atenuadas por inoculación de la forma esporulada al bovino, hemos tenido accidentes de muertes tardías en estos animales, en forma semejante a lo acontecido con los cobayos de la experiencia anterior.

De un lote de 50 bovinos, murieron 10 a consecuencia de la inoculación de una pretendida vacuna, en distintos lapsos de tiempo; algunos a los once días, habiéndose producido grande edemas en el punto de inoculación en estos animales. Observamos que antes de la muerte de los que más tardaron en morir, los edemas del punto de inoculación, o habían desaparecido, o encontrábamos que el exudado se había infiltrado por declive en las partes bajas; en resumen: el proceso inflamatorio había desaparecido.

Por lo expuesto, debemos concluir haciendo abstracción de la puerta de entrada, que la lesión más antigua y más importante, en la infección carbunclosa, es la del bazo. Si tomamos estos casos referidos y el del carbunclo típico de un bovino muerto de carbunclo natural, por ejemplo, nos encontramos también en este caso, conque la lesión primaria y de mayor entidad es la alteración del bazo que, si evidente en los primeros, es también de gran realidad en éste, aunque la infección haya tenido un carácter fulminante.

Acerca de las vías de infección, especialmente en el llamado "carbunclo interno" del hombre y de los animales, vamos a relatar en forma sumaria una comunicación de Sanarelli leída por Roux en la Academia de Ciencias de París en el año 1924. Este investigador hace ingerir a conejos y cobayos grandes cantidades de esporos de *B. anthracis* virulentos sin que éstos tomen la infección. Sin embargo, muchos de estos esporos atraviesan la pared intestinal como lo demuestra el hecho de que sacrificando a distintos intervalos un número de estos animales y dejando otros como testigos, ya a las seis horas se encuentran esporos en pulmones, hígado e intestinos; a las 24 horas se pueden obtener cultivos del germen, sembrando bazo. Los animales guardados como testigos no han contraído el carbunclo. Inocula también al conejo por vía respiratoria,^a con una dosis sub-mortal de 50.000 esporos y observa que éstos son fagocitados por macrófagos del pulmón, que evitan su germi-

nación. Del pulmón los fagocitos con esporos llegan a la circulación y van a detenerse en muchos órganos donde se mantienen varios días sin que pululen, si no interviene una causa adyuvante y, con el tiempo son lisados por las secreciones celulares o descargados en el intestino. Estos esporos inoculados en el árbol respiratorio, pueden ser encontrados en el bazo a los cinco días y en el pulmón hasta los trece días.

Si después de varios días de la inoculación se inyectan diversas sustancias, especialmente ácido láctico, a la dosis de un centímetro cúbico de una solución al 5 %, por vía subcutánea; o si se les calienta, o si se les disminuye la ración, estos animales "portadores" de esporos mueren de la infección carbunclosa. En consecuencia, dice el autor: "estos experimentos ayudan a explicar la génesis, hasta este momento tan oscura, del carbunco llamado "interno" o "espontáneo", en el que el proceso mórbido, se desarrolla, generalmente, sin manifestaciones externas, es decir, sin pústula maligna, en el hombre, y sin infiltraciones edematosas de los tegumentos, en los animales,"

Sobre la persistencia de los esporos del B, anthracis en el organismo, podemos agregar aún, las siguientes experiencias: Basset (1933) inoculando esporos de vacunas a conejos, observa que aún después de un mes, se puede desencadenar la infección con una inyección de ácido láctico. Ramón y Falchetti (1935), inoculando a esta misma especie animal, esporos de B. anthracis incorporados a lanolina, han podido observar la persistencia de éstos "in locus" aún a los 23 días.