

ESTUDIO  
SOBRE LOS METODOS DE INMUNIZACION  
CONTRA EL ANTHRAX



TRABAJO PRESENTADO A LA FACULTAD  
DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA  
COMO TESIS DOCTORAL POR  
HILDA PURA MEJIA



ENERO DE 1957

075335

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE  
EL SALVADOR

RECTOR: DR. ROMEO FORTIN MAGAÑA  
SECRETARIO GENERAL: DR. JOSE ENRIQUE CORDOVA h.

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS  
Y DE FARMACIA

DECANO: DR. VICTOR ORTIZ  
SECRETARIO: DR. JOSE M. TEJADA



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y DE FARMACIA.

Jurado del Primer Examen Privado de Doctoramiento

- Dr. Luis Aristides Amaya
- Dr. Marie Castro Salguer
- Dr. Luis Andres Carias

Jurado del Segundo Examen Privado de Doctoramiento

- Dr. Julio C. Moran Ramirez
- Dr. Carlos Mata Gavidia
- Dr. Francisco Gonzalez Suvillaga

Jurado de Doctoramiento Publico

- Dr. Concha Lemus
- Dr. Carlos Mata Gavidia
- Dr. Luis Aristides Amaya

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10126378

DEDICATORIA:

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS FAMILIARES Y

A MIS AMIGOS

CON CARINO Y GRATITUD.

I N T R O D U C C I O N  
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

En la actualidad la labor del profesional egresado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, no está limitada al recetario de un establecimiento Farmacéutico; sino que vemos profesionales prestando servicio a la comunidad en diversos Laboratorios: Agrícolas, Químicos, Industriales, Bacteriológicos, Biológicos, es decir, en todos aquellos lugares donde ponen en práctica los conocimientos, tratando de mejorar el nivel cultural, social y económico de nuestro País.

Es por esto, que la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia está extendiendo el Plan de Estudios hacia los campos científicos donde la Química predomina como base fundamental.

He escrito las anteriores frases, como un reconocimiento de avance a las actuales autoridades de la Facultad, que han dotado al Establecimiento, con un equipo moderno y eficiente de Laboratorio y un Plan de Estudios del cual se esperan óptimos resultados.

PLAN DE TRABAJO.  
!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ESTUDIO BACTERIOLOGICO DEL ANTHRAX

INCIDENCIA EN LOS HUMANOS EN NUESTRO PAIS

TRATAMIENTO

INCIDENCIA EN EL GANADO EN NUESTRO PAIS

TRATAMIENTO E INMUNIZACION

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA.

oOo

## G E N E R A L I D A D E S

El Anthrax, fiebre carbónica o fiebre esplénica es una de las más importantes y más antiguas enfermedades infecciosas descritas en Veterinaria. La enfermedad es causada por el Bacilo Anthracis y es fatal para el ganado, es endémica en Centro y Sur América.

El Anthrax tiene una importancia histórica, siendo la primera de las enfermedades infecciosas del hombre y de los animales domésticos, la que se demostró ser causada por un Microorganismo específico.

El Anthrax es principalmente una enfermedad de los animales herbívoros, aunque cerdos, perros, gatos y algunos animales silvestres pueden ser afectados. El hombre es también receptible; la enfermedad en los seres humanos es conocida como Pústula Maligna y enfermedad de los cardadores de lana. Los pájaros, las aves de corral son prácticamente inmunes.

En el hombre, el tipo de Anthrax depende usualmente de la vía o ruta de infección.

El Anthrax del pulmón es contraído por inhalaciones de esporas de anthrax. La enfermedad evoluciona con el cuadro de una pulmonía. Es muy difícil de diagnosticar y generalmente fatal. El Anthrax de la piel o pústula maligna es generalmente contraído por el manejo de animales que han muerto a causa de la enfermedad, los organismos entran en el cuerpo a través de un rasguño o herida en la piel. Cuchillos infectados, brochas de afeitarse y pelos contaminados han sido responsables de transmitir la enfermedad al hombre. Si el organismo entra en la circulación sanguínea, produce septicemia.

El Anthrax intestinal resulta de comer carnos mal cocinadas

de un animal infectado de anthrax. Es extremadamente raro.

De los animales domésticos las ovejas son las más receptibles a la enfermedad, después sigue el ganado bovino. Sin embargo, ellos no son receptibles a la infección artificial producida por inyección subcutánea de cultivos virulentos. Frecuentemente se observa que sólo una reacción local sigue a la inyección. Pero si los bacilos son introducidos por vía intravenosa u oral la enfermedad se produce. Sigue después del ganado bovino en orden de receptibilidad, el caballo y el mulo. Los cerdos tienen alto grado de resistencia aunque en ocasiones son afectados; la enfermedad en tales animales ocurre en la garganta y dá al animal la apariencia de tener Paperas. El ratón es el animal más receptible a la enfermedad de los animales de experimentación. Los conejos y los cuyos son también receptibles. Mientras las ratas blancas son altamente resistentes. La sangre, fluidos y extractos de tejidos de casos de anthrax son particularmente virulentos cuando son inoculados en animales receptibles. Tal material es más virulento que cultivos puros.

El anthrax cuando ocurre en el animal herbívoro se manifiesta por una aguda infección.

En la Necropsia, el bazo se encuentra alargado, su consistencia es una pulpa oscura y tan blanda que al hacer una extensión es semifluida. Se encuentran infiltraciones gelatinosas y extravasaciones de sangre en los tejidos subcutáneos y hemorragias en varias partes del organismo, particularmente en las membranas cerosas. El hígado y los riñones están congestionados, inflamados y revelan una degeneración parenquimatosa. El trayecto intestinal usualmente muestra una severa enteritis con áreas hemorrágicas de diversos

tamaños. Los pulmones están congestionados y contienen pequeñas hemorragias. Las glándulas linfáticas aparecen inflamadas y secciones de ellas están congestionadas y hemorrágicas. La sangre es de un rojo obscuro y no se coagula.

Transmisión en el campo. Los animales infectados de anthrax al morir presentan hemorragias; en los charcos de sangre hay incontable número de bacilos activos, los pastos quedan infectados y así permanecen contaminados por muchos años.

Aquí en nuestro País, las más grandes epidemias de anthrax ocurren al final de la estación seca porque en este tiempo la hierba casi ha desaparecido o se ha vuelto tan corta en los campos que los animales al alimentarse comen tierra y en ese tiempo hay un gran número de esporas.

Las esporas de los organismos son también esparcidas por las corrientes de los ríos. La lluvia juega un papel importante en la diseminación de la enfermedad.

Los animales carnívoros: perros, gatos y cerdos pueden contraer el anthrax comiendo carnes de animales muertos por la enfermedad.

Los pájaros pueden diseminar la enfermedad llevando pedazos de carne o comer carne infectada y eliminando las esporas por las heces.

El zopilote ha sido nombrado como agente diseminador entre los animales y en algunos casos del animal al hombre.

Stiles ha aislado los organismos procedentes de colonias que obtuvo de los marchamos de unas vacas muertas por anthrax. También observó que las garrapatas pueden ser un vector del bacilo.

#### ESTUDIO BACTERIOLOGICO.

La familia Bacillaceae se divide en 2 Géneros: Bacillus y Clostridium, comprendiendo el primero las especies aerobias esporuladas



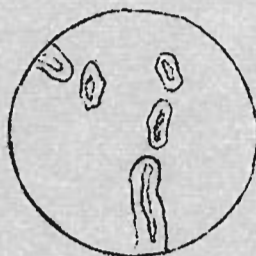
El único que consideraremos será el primero.

El Género Bacillus comprende muchas especies prácticamente idénticas en cuanto a morfología. Así tenemos el B. anthracis, B. anthracoides o pseudoanthracis, B. subtilis, B. mesentericus y vulgaris, B. megatherium, B. mycoides, B. cereus y B. rotans. Algunos llaman Bacillus pseudoanthracis, designación inexacta pero conveniente, a todo organismo aerobio esporulado que pueda ser confundido con el verdadero B. anthracis, que es la única especie patógena.

#### MORFOLOGIA Y COLORACION.

1) El B. anthracis es un bacilo grande, inmóvil, esporulado que mide de 1 a 1.5 micras de grueso por 4 a 8 micras de longitud, forma largas cadenas sobre todo en los medios de cultivo. En la sangre y líquidos orgánicos de animales infectados se encuentran algunas veces en cadenas cortas, junto con algunas formas aisladas y en parejas.

Típicamente, los extremos del bacilo aparecen en cortes recto o ligeramente cóncavo. Sin embargo, en algunas preparaciones coloradas, los extremos aparecen redondos, por lo cual la forma del extremo del bacillus puede algunas



veces ser atípica. Es muy característica la cápsula mucoida del bacilo carbuncoso, la cual aparece muy desarrollada en las cepas virulentas, sobre todo cuando procede de la sangre o líquidos orgánicos. En los cultivos, la cápsula es bien aparente cuando el

gérmen crece en leche o en medios de suero u otro material albuminoso.

Las esporas del B. anthracis sólo se forman en presencia de oxígeno y en consecuencias no se hallan en la sangre ni tejidos de los animales infectados, a menos que los mismos sean expuestos al oxígeno libre, el tiempo suficiente para la formación de esporas. Las esporas formadas son centrales, elipsoidales, no doorman al bacilo, gorminan polarmente y miden de 0.7 a 0.8 micras de ancho por 1 a 1.5.

El bacilo anthracis se tiñe con las anilinas corrientes y los elementos jóvenes son Gram positivo, mientras los viejos pueden presentarse como Gram negativos.

Las esporas no se tiñen con los métodos ordinarios exigiendo para ello los métodos especiales para coloración de esporas, sucediendo lo mismo con las cápsulas que se destacan con los métodos especiales de coloración para ellas; aunque con el método de Gram puede verse la cápsula con frecuencia cuando las preparaciones son hechas directamente de los tejidos animales.

Las preparaciones fijadas y teñidas durante 2 o 3 minutos con una mezcla de Fuchina fenicada (una gota) y azul de metileno de Leofflor (10 gts.) en 10 cc. de agua destilada, constituyen también un buen método para evidenciar las cápsulas.

#### CARACTERES CULTURALES.

El B. anthracis es aerobio, creciendo también, aunque menos satisfactoriamente, en condiciones anaerobias. Se desarrolla a temperatura corriente de estufa 37°. 5, aunque sigue desarrollándose entre límites térmicos de 12° a 45°, fuera de estos límites no hay formación de esporas. Los cultivos durante un cierto período de tiempo, a cierta

temperatura elevada, reducen la virulencia de la bacteria.

El *B. anthracis* crece en la mayoría de los medios de cultivo. Prefiere reacción ligeramente alcalina, p H 7. 5 a 7. 8 o neutro; aunque su crecimiento no es detenido por la acidez.

Agar. En la superficie, las formas virulentas del *B. anthracis* forman colonias rugosas, ligeramente elevadas, blancogrisáceas, de aspecto de escarcha, opacas, con bordes ligeramente irregulares.

Al examinar las colonias con el microscopio muestran un centro denso, grisáceo, compacto, ondulado, rodeado de filamentos parecidos a cabellos, menos apretados cuanto más separados en la periferia de la colonia (colonias de medusa.)

Las copas avirulentas o atenuadas producen un tipo de colonia más lisa, con bordes ligeramente cromados. Es más pequeña, más compacta y más húmeda que la forma rugosa virulenta.

En Agar inclinado, el desarrollo es blancogrisáceo, granular, confluyente, adherente.

GELATINA. Las colonias en su superficie son similares a las del Agar. Hay ligera licuación. En columna hay crecimiento a lo largo de la línea de siembra más abundante en su comienzo. Hay filamentos radiados desde la superficie dando un aspecto general de cono invertido, llamado "abeto invertido". La licuación de la gelatina por el *B. anthracis* se verifica más lentamente que por el *B. Subtilis*. Además el *B. Subtilis* no forma el típico "abeto invertido", clásico del *B. anthracis*.

CALDO. No se enturbia con las copas naturales del *B. anthracis* sin atenuar. El desarrollo es flocular con sedimentos en el fondo, dejando el caldo claro. Si el tubo se agita suavemente, hay una ligera turbidez parecida a peluza de algodón, que se levanta del

fondo y cae otra vez despaciosamente.

Las copas atenuadas producen alguna vez enturbiamiento del caldo, sobre todo tras prolongada incubación.

PATATA. El crecimiento es abundante, extendiéndose sobre toda la superficie del medio y esporulando rápidamente.

Resistencia. El bacilo carbuncozo vegetativo no es muy resistente, siendo destruido en quince minutos, a 60°C. Se mata con facilidad con los antisépticos ordinarios en soluciones corrientes.

Por el contrario, las esporas carbuncosas son unas de las formas más resistentes que pueden hallarse entre los microbios. En ciertas condiciones las esporas persisten durante años sin perder su virulencia. En la tierra, agua, pieles etc. la espora carbuncoza vive durante años y se ha comprobado que pueden germinar después de 15 a 24 años de haber permanecido en el suelo.

La salmuera, el salado y el curado no atacan a las esporas en la carne así tratada.

El calor seco es mucho menos efectivo para destruir las esporas del bacilo carbuncozo que el calor húmedo. Se requirieron 3 horas de exposición a la temperatura seca de 140 C. para destruir la espora, en tanto que, en medio líquido o expuesto directamente a vapor fluctuante, una temperatura de 100°C es suficiente para matarla en 8 minutos. Esta diferencia en temperatura es debida a la densa naturaleza de la espora. Esta característica es la responsable del hecho químico de que los agentes oxidantes son más efectivos como desinfectantes que otras sustancias. Se ha demostrado que 1 por 1000 de solución de bicloruro de mercurio y 5% de agua oxigenada matará a las esporas en una hora y 4% de permanganato de potasio en 15 minutos. Una solución reciente de hidróxido de sodio al 5% es satisfactoria

para desinfectar objetos, que han sido contaminados. Sin embargo, la acción cáustica del hidróxido debe ser considerada cuando se usa sobre utensilios de vidrio y de metal.

Stein y Rogers han hecho indicación de que las esporas del Anthrax pueden escapar dentro de la atmósfera durante el calentamiento de las suspensiones de ollas en objetos abiertos.

Tiene gran importancia esto desde el punto de vista de la contaminación en el laboratorio con esporas de anthrax.

Las jeringas y las agujas contaminadas con B. anthracis nunca deben ser esterilizadas en recipientes abiertos.

Propiedades Bioquímicas.- El organismo forma ácido en la dextrosa, sucrosa, maltosa, levulosa y salicine pero no en la lactosa Manitol o inulina. No forma gas.

Acido sulfhídrico e Indol no son producidos. Los nitratos son reducidos a nitritos, amoníaco no es producido. La leche tornasolada es coagulada, decolorada y ligeramente peptonizada y algunas copas de tipo muy virulento son capaces de reducir el azul de metileno y hemolizar la sangre de ovinos.

Antígenos y Toxinas. En el B. anthracis parece haber 2 sustancias antigénicas.

Una sustancia proteínica es encontrada en la cápsula, la cual semeja a la de muchos otros organismos y es un polipéptido del ácido glutámico (Ivanovic y Bruckner) La otra es un antígeno somático polisacárido que contiene d-glucosamina y galactosa en proporción equimolecular.

Los sueros anticarbuncosos del comercio únicamente suelen contener las precipitinas correspondientes al antígeno polisacárido.

Toxinas no son producidas.

Reacciones Serológicas. La precipitación y la fijación del complemento se pueden utilizar para el diagnóstico del carbunco.

Diagnóstico de Laboratorio para casos de animales. El examen de las muestras para el diagnóstico del anthrax es de grave responsabilidad. Un diagnóstico positivo da lugar a varios resultados tales como vacunación del ganado, procedimientos de desinfección, destino de productos lácteos y problemas relativos a la transmisión de la enfermedad al hombre. Por el contrario un fallo del diagnóstico puede tener desagradables consecuencias.

Los B. anthracis, como se dijo, pueden ser fácilmente aislados de varios órganos, glándulas, fluidos edematosos y sangre de animales que han muerto a causa de la enfermedad.

En el animal vivo los bacilos no pueden ser demostrados en la circulación de la sangre hasta unas pocas horas antes de la muerte. En raras ocasiones la infección puede ser encontrada en la sangre 30 o 48 horas antes de la muerte.

En la investigación del anthrax con frecuencia se encuentran en el laboratorio organismos que semejan esporas y bacilos de anthrax y para diferenciarlos puede usarse el siguiente cuadro:

<u>Bacillus anthracis.</u>	<u>Bacillus pseudanthracis.</u>
1.- Inmóvil	Generalmente móviles
2.- Capsulado	No capsulados
3.- Crece en largas cadenas	Crece en cortas cadenas
4.- No enturbia el caldo	Frecuentemente lo enturbian
5.- Imagen de abeto invertido en gelatina	Abeto invertido ausente o atípico
6.- Reacción precipitante polisacárida fuertemente positiva	Débilmente positiva
7.- Patógeno a animales de Laboratorio	No patógenos
8.- Licúa lentamente la gelatina	La licúan rápidamente.

También Stein hizo un estudio intensivo sobre este asunto y en la tabla siguiente da los puntos de diferencia entre bacilo Anthracis y Anthrax como organismo

PRINCIPALES PUNTOS DE DIFERENCIA ENTRE EL B. ANTHRACIS  
Y ORGANISMOS PARECIDOS.

Organismo	Patógenos para el cuyo	Motilidad (Método de gota pendiente)	Reducción del azul de metileno. Crecimiento de 48 horas.	Completa hemolisis de glóbulos rojos (Prueba de tubo)	Licuefacción de gela tina.	Acción sobre leche torna solada	marcada acidez en Salicina 48 horas	Características generales de crecimiento.
B. Anthracis	x	-	-	-H	lenta	lenta	-	clara o ligeramente turbia
B. Cereus	-	x ó xx	xx	xxx	rápida	rápida	x ó xx	Turbia
B. Siamensis	-	xx	xx	xx	rápida	rápida	-	Turbia
B. Tropicus	-	xx	xx	xx	rápida	rápida	x	Turbia
B. Subtilis	-	xxx	V	-H	lenta	lenta	V	ligeramente turbia o a veces clara
B. Micoides	-	-	-	-H	lenta	lenta	V	Clara
B. Mesentericus	-	xxx	-	-	lenta	lenta	x	Turbia

- Características dadas que son comunes a la mayor parte de cepas examinadas

x Más ácido-positiva

-H Algunas ligeramente hemolíticas

V Variables

En esta investigación por Stein, los exámenes para la hemólisis fueron hechos por adición de 1 cc. de una suspensión al 5% de glóbulos rojos de carnero en solución salina fisiológica a una igual cantidad de organismos que tengan 24 horas de incubación en caldo.

En el examen para la reducción de azul de metileno, se usa 10 cc. de un medio cultivo y 3 cc. de 0.04% de azul de metileno.

Con muestras colocadas y recogidas en conformidad y llevadas al Laboratorio casi no existe dificultad en hacer el diagnóstico del anthrax; por el contrario, cuando los materiales son obtenidos de un animal en putrefacción o las muestras no han sido debidamente preservadas se tropieza con dificultades para establecer un diagnóstico exacto.

Así ocurre en todos los otros exámenes de laboratorio, se requieren muestras debidamente recogidas y preservadas para un rápido y concluyente resultado. Cualquier espécimen podría ser puesto en frascos dobles, bien cerrados y tener cuidado que la cubierta o envoltura no se contamine.

El siguiente procedimiento es recomendado al llegar los especímenes al laboratorio.

1) Examen microscópico de sangre o de tejido debe ser hecho. Esto debe hacerse como primer paso. Es extremadamente arriesgado, diagnosticar anthrax sobre la base de un sólo examen microscópico porque en algunos casos extraños organismos, semejantes a los Bacilos anthracis pueden estar presentes, tal como lo dijimos anteriormente.

2) El material sospechoso debe sembrarse o incubarse a 37.5° C. Después de una noche de incubación, el cultivo debe ser examinado por colonias típicas de anthrax. Pueden examinarse con un microscopio de poca intensidad para ver las formas típicas de cabeza de



medusa con que aparecen las colonias.

Deben ser hechos exámenes para Motilidad y coloración

Las colonias típicas pueden transferirse a caldo y a medios de cultivos sólidos para futuros exámenes.

Al mismo tiempo que los cultivos son hechos deben inocularse subcutáneamente a cuyos con una suspensión salina del material. Si el material contiene B. anthracis los cuyos mueren dentro de 36 a 72 horas.

Se ha podido denunciar la existencia de B. anthracis en materia los malamente contaminados con otros organismos, particularmente con organismos propagadores, haciendo una suspensión salina del material en 1 ó 2% de fenol y dejándola 1 hora y luego cultivando este material después de ese tiempo. Los B. anthracis usualmente resisten esta cantidad de fenol mejor que muchos otros organismos, los cuales son destruidos por él. Los cuyos o ratones mueren como resultado de una inyección del material virulento mostrando características de la enfermedad. Los B. anthracis pueden ser encontrados en la sangre de estos animales en el laboratorio.

Cuando se trata de casos humanos se procede de la manera siguiente:

La muestra debe obtenerse del contenido de las vesículas y an fractuosidades y en determinadas circunstancias raspar con cureta las paredes de las bulas o inyectar suero fisiológico en la lesión sospechosa, el cual vuelve a aspirarse para examen. Este último procedimiento tiene la desventaja de ser sumamente doloroso.

1) Se hacen extensiones que se colorean por el método de Gram. La presencia de bacilos con las características morfológicas del B. anthracis es un hecho sospechoso y sólo tiene valor para hacer un

diagnóstico presuntivo, debiendo confirmarse con el cultivo

2) Se cultiva en caldo, agar y gelatina. De 24 a 42 horas después se procede al examen. La presencia de colonias con aspecto de cabeza de medusa y demás particularidades hacen el diagnóstico. En las extensiones el bacilo se ha vuelto esporulado.

3) Dobe hacerse sistemáticamente un hemocultivo ante la posibilidad de una septicemia.

4) En caso de duda se procede a la inoculación en animales de Laboratorio. El *B. anthracis*, dijimos en las generalidades, mata rápidamente al ratón, cobayo y conejo y menos a menudo a la rata; de los tres primeros animales el más susceptible es el ratón, el menos el conejo, ocupando el cobayo una posición intermedia. Se inyecta por vía subcutánea (lorsó o pierna) o intraperitoneal, lee de cultivo en caldo de 24 horas o con una suspensión en suero fisiológico. Se produce una septicemia fatal en un período que oscila entre 2 o 3 días. En el punto de inoculación se encuentra un edema hemorrágico gelatinoso. Las vísceras están congestionadas, siendo la sangre de color rojo obscuro con coagulación disminuida. Se encuentran grandes cantidades de bacilos en la lesión local, sangre, bazo, hígado y otros órganos. Se hacen extensiones con la sangre y el bazo y se tiñen por el método de Gram; asimismo se cultiva.

Aun cuando la enfermedad termina en una septicemia, no es sino hasta 4 o 5 horas antes de la muerte que invade la corriente sanguínea.

Si se tiene prisa en hacer la inoculación se procede a inocular el material sospechoso sin esperar el aislamiento de cultivos puros. También podría hacerse, con el material pútrido, oscarifica-

ciones en 3 a 4 ratones, ya que el *B. anthracis* gana la corriente sanguínea antes que los otros microorganismos (método de purificación en animales de experimentación,)

5) En caso de formas pulmonares o intestinales, deberán practicarse los exámenes de aglutinina, opsoninas y anticuerpos fijadores del complemento.

6) La reacción precipitante de Ascoli es usada para demostrar el Anthrax en los tejidos y órganos de animales, puede ser usada también con cualquier material sospechoso. Se basa en la presencia de un antígeno termolábil, el cual da un precipitado con un potente suero anti-anthrax. Es un método simple y rápido, pero cuya desventaja es la dificultad en conseguir un suero seguro y apropiado. Según Hagan la mayoría de sueros no llenan ese requisito.

Procedimiento (Hagan:)

a) El material sospechoso es finalmente cortado y colocado en tubos que contengan poca cantidad de suero fisiológico.

b) Los tubos se colocan en baño de vapor durante 5 a 10 mts., tiempo suficiente para que los antígenos específicos del *B. anthracis* (estén vivos o muertos,) sean disueltos.

c) Filtrar hasta conseguir un líquido claro.

d) Esto se coloca en tubos angostos con el suero anti-anthrax. Si es positiva la reacción se forma pocos minutos después un anillo blanco en la línea de contacto.

#### ANTHRAX EN EL HOMBRE.

El hombre se infecta principalmente:

1o.) Por contacto directo con animales muertos de Anthrax (forma agraria o no industrial.)

Es rara la transmisión de hombre a hombre o de animal a animal. Es posible, pero aún más difícil, el contagio por insectos infectados, así como también el debido a la leche. Se ha mencionado el contagio por brochas de afeitarse mal esterilizadas.

El bacillus anthracis penetra al cuerpo por 3 vías principales:

- a) A través de pequeñas soluciones de continuidad de la piel. (forma cutánea.)
- b) Por la inhalación de polvo que contiene esporas (forma pulmonar.)
- c) Por la ingestión de alimentos contaminados (Forma digestiva.)

En 16 de los casos habidos en el Hospital Rosales en un año la forma de contagio fue como se detalla a continuación:

<u>Contagio.</u>	<u>No. de casos.</u>
Quitando la piel a animales infectados .....	9
Contacto (sin especificar) con animales infectados.....	3
Haciendo "aparejos" y albardas.....	2
Contacto con carne.....	1
Contacto con sangre.....	1
Total .....	16

Como se ve, 14 casos pueden incluirse en la forma agraria de la enfermedad y 2 en la forma industrial.

Si además se considera que uno de los enfermos era tejedor y otra costurera (¿contagio por hilos?) se puede tal vez agregar 2 casos más a la forma industrial.

#### F R E C U E N C I A .

En Estados Unidos de Norte-América se reportan de 60 a 80 casos de Anthrax anualmente. En nuestro País (sólo Hospital Rosales,) se encuentran 81 casos en 5½ años, lo que da un promedio anual aproximadamente de 15 casos. Esto denota una incidencia alta en comparación con Estados Unidos, dadas las grandes diferencias de territorio y población entre ambos países.

OCUPACION.

Oficio.	No. de casos
Jornalero .....	42
Domésticos .....	22
Escolares .....	3
Boyero (carrotero).....	2
Carpintero .....	2
Corralero .....	1
Agricultor .....	1
Tejedor .....	1
Costurera .....	1
Total ...	75

Hay dos casos en que se ignora la ocupación. Se ha incluido un campista entre los jornaleros, ya que en nuestro País, el término jornalero se da principalmente al trabajador del campo. Hay 4 casos de pacientes lactantes, todos ellos procedentes de áreas rurales y cuyas madres refieren que además de vivir en chozas, en hacinamiento con los animales domésticos (perros, gatos,) los dejan por sus ocupaciones, en el suelo, que es de tierra y de donde observan posteriormente el apareamiento del "carbunco".

Para mejor ilustración en cuanto a frecuencia de sexo, edad, condición urbana o rural etc. véase el siguiente cuadro:

ANTHRAX EN HUMANOS.  
CASOS CLASIFICADOS SEGUN EDAD, SEXO Y PROCEDENCIA DE  
LOS PACIENTES.

Edad en Años	TOTAL	URBANO		RURAL	
		Masc.	Fem.	Masc.	Fem.
Menos de 1	1	-	-	-	1
1 - 4	3	1	1	1	-
5 - 9	-	-	-	-	-
10 - 14	5	2	1	2	-
15 - 19	4	-	-	4	-
20 - 24	10	1	2	3	4
24 - 29	9	1	1	5	2
30 - 34	12	3	1	6	2
35 - 39	10	3	1	4	2
40 - 44	7	-	1	2	4
45 - 49	8	2	-	3	-
50 - 54	3	1	-	2	-
55 - 59	2	-	-	1	1
60 - 64	4	2	1	1	-
65 - 69	2	-	-	2	-
70 - 74	-	-	-	-	-
75 - 79	-	-	-	-	-
80 - 84	1	1	-	-	-
85 - o más	-	-	-	-	-
TOTAL	81	17	9	36	19

ESTUDIO CLINICO.

El Anthrax es una enfermedad infecto-contagiosa causada por el Bacillus anthracis.

LOCALIZACION.

Según sea la vía de contagio, el Anthrax puede revestir 3 formas principales: 1) Anthrax cutáneo, 2) Anthrax pulmonar y 3) Anthrax gastrointestinal. De ellas la más frecuente es la forma cutánea (95%.) El Anthrax pulmonar se veía antiguamente con mayor frecuencia, pero el advenimiento de las Leyes Laborales lo han hecho casi desaparecer; allí el predominio lo ataque a la superficie cutánea.

Debido a la facilidad de contagio, esta forma de Anthrax se presenta con mayor frecuencia en las zonas descubiertas del cuerpo, dependiendo la localización del tipo de trabajo; así, en los cargadores se encontrará sobre todo en la nuca y espalda y en los jornaleros en los miembros superiores e inferiores.

El estudio de un cuadro topográfico comparativo es el que se ha tomado de acuerdo con los trabajos de Legge (1934) en Inglaterra y el de los Doctores Rutilio Aguilera (1947) y Luis C. Alfaro, (1955) en El Salvador.

	LEGGE		AGUILERA		Estudio Alfaro	
	Casos	%	Casos	%	Casos	%
Cabeza	418	44.6	7	25	19	23.5
Cuello	292	31.2	5	17.8	13	16.1
Miembros superiores	191	20.4	15	53.6	41	50.6
Miembros inferiores	18	1.9	0	0	4	4.9
Tronco	397	100.-	28	100	81	100.-

Como se ve, la localización del Anthrax en El Salvador es sobre todo en los miembros superiores (la mitad de los casos) siguiendo en orden de frecuencia la cabeza, el cuello, miembros inferiores y tronco. Es digno de mención el hecho de que los porcentajes de los

2 trabajos hechos en el País son casi similares, es decir, que las causas que influyen en la topografía de la lesión se mantienen aun inalterables.

Si comparamos la estadística inglesa con la salvadoreña, vemos que hay diferencia en cuanto a frecuencia de localización. En Inglaterra es el Anthrax de la cabeza el que ocupa el primer lugar (con poco menos de la mitad de los casos) siguiéndole en frecuencia el cuello, miembros superiores, miembros inferiores y tronco. Así pues, lo que en Inglaterra ocupa el tercer lugar, en nosotros ocupa el primero. Atribuyendo esta diferencia al tipo de trabajo desarrollado: el jornalero, nuestro trabajador del campo está más expuesto al contagio, ya que en sus labores cotidianas son los miembros superiores los que mayor actividad desarrollan. En Inglaterra, los cargadores de los muelles que son los que en gran parte padecen la enfermedad llevan sobre sus hombros y en contacto con la cabeza y cuello las pacas de lana que importan para su industria.

Cosa curiosa es el alto porcentaje que tenemos de Anthrax del tronco y miembros inferiores. El salvadoreño localiza dos y media veces más que el inglés, la lesión en estas partes del cuerpo. Esto podría atribuirse a los hábitos de vida, puesto que, nuestra gente acostumbra a cubrir su cuerpo con pocos o ningún vestido, lo que deja al descubierto esas porciones del cuerpo, además andan generalmente descalzos y con los pantalones arrollados.

#### SINTOMATOLOGIA.

Anthrax cutáneo.- El período de incubación varía de 24 hrs. a 5 días con un promedio de 3 días. Sin embargo se reportan únicamente 6 casos en que el período de incubación transcurrió entre el posible contagio y la aparición de los primeros síntomas. Este lap

so de tiempo tuvo un mínimo de 1 día y un máximo de 25 días, con una media de 6 días.

La lesión inicial puede ser una pequeña "mancha" que tiene la apariencia y dimensiones de "una picada de pulga", por lo que algunos le han dado el nombre de "pulga maligna". Algunos pacientes tuvieron esa forma de comienzo, quienes la compararon a una picada de "chincho", de "nigua", de "pulga" o de insecto en general.

Otras veces comienza por una pequeña pápula que crece progresivamente de tamaño. En el resto de los casos la lesión inicial fue aparentemente una vesícula, una ulceración o una escara.

La lesión inicial progresa hasta convertirse en una vesícula pruriginosa que el enfermo destruye con el rascado y la convierte en una zona ulcerosa que se necrosa después y toma color negro por lo que también se le ha dado el nombre de "carbón o carbunco". Esta lesión central es rodeada de gran número de vesículas de diferentes tamaños, todo lo cual se acompaña de edema que por lo general es considerable y eritema. El término "pústula" para esta lesión no es apropiado ya que su contenido no es purulento, sino que se trata de un líquido amarillento seroso. A menudo se acompaña de linfagitis y adenopatías regionales; algunas veces de flebitis.

La figura clásica en escarapela no es constante y no debemos esperar encontrar sus tres constituyentes para hacer el diagnóstico: vesículas, necrosis central y edema. En el estudio del Dr. Alfaro se encontró en 54 casos (66.7%); una lesión úlcer-necrótica con edema en 18 casos (22.2%) y una zona vesicular acompañada de edema en 9 casos (11.1%). De lo anterior se desprende que el signo que nunca falta es el edema ya que se encuentra en todos los



casos. La intensidad del edema está en relación con la gravedad del caso.

Al resolverse la lesión dermatológica deja por lo general una cicatriz que puede o no ocasionar consecuencias según el sitio de localización.

Los síntomas generales que se presentaron con mayor frecuencia fueron: cefalos, escalofríos, fiebre, insomnio, malestar general y adinamia. Si el Anthrax está localizado en el cuello o parte superior del tórax puede ocasionar dificultad en la deglución y respiración u odinofagia, síntomas debidos posiblemente a la compresión por el edema; tal pasó en 4 casos del Estudio del Dr. Alfaro. La aparición de síntomas digestivos (vómitos, diarrea y dolores abdominales) son de mal pronóstico ya que los 4 enfermos que los presentaron fallecieron. En dos casos hubo shock, muriendo uno de los pacientes.

#### TRATAMIENTO.

Todo tratamiento quirúrgico de la lesión local está completamente contraindicado por el peligro de diseminación.

El advenimiento del suero anticarbuncoso en dosis de 100 a 300 cc. diarios mejoró enormemente el pronóstico de la enfermedad. Su forma de actuar es desconocida puesto que no tiene bactericinas ni antitoxinas y su contenido de aglutininas no es mayor que el normal. Clor (1906) cree que hay opsoninas y cuerpos fijadores de complemento.

Gold (1942) obtuvo magníficos resultados empleando sulfonamidas.

En la actualidad tanto la penicilina, sola o asociada al arsénico, aureomicina o terramicina son capaces de curar la mayoría de los casos. En el Hospital Rosales se emplearon varias combinaciones de medicamentos con los siguientes resultados:

CASOS CLASIFICADOS SEGUN EL TRATAMIENTO RECIBIDO Y  
RESULTADO OBTENIDO

Drogas	Casos	Curados	Mejorados	Fallecidos
Penicilina	29	25	3	1
Penicilina-Arsénico	33	31	1	1
Penicilina-Sulfamidados	9	5	3	1
Penicilina-Arsénico-Sulfam.	4	3	1	
Penicilina-Terramicina	2	2		
Penicilina-Terramicina Sulfamidados	2	2		
TOTAL	79	68	8	3

Hay un caso que no recibió tratamiento específico y otro en que se ignora el estado de la salida.

Hasta Agosto de 1952 se empleó la combinación Arsénico-Penicilina y desde entonces solo Penicilina.

Como tratamiento local se emplearon principalmente lienzos de Sulfato de Magnesia y Permanganato de Potasio.

Anthrax en el ganado.- En las generalidades se habló de cómo se manifiesta el Anthrax en los animales, su localización y cómo se transmite.

Un brote de Anthrax en un hato de ganado incluye, entre otras cosas, todo lo referente a la leche. Se aconseja generalmente la cuarentena en un hato, hasta de 3 semanas después del último caso de defunción.

Se recomienda también tomar diariamente la temperatura a los animales y remover inmediatamente cualquiera que muestre un aumento de temperatura.

Terapia por suero. En 1895 Marchow y Schavo prepararon un suero anti-anthrax procedente de oveja y caballos inmunizados contra la enfermedad. Muchos casos fueron salvados por el suero, su uso

es ampliamente justificado donde los ensayos son hechos en el tratamiento de animales infectados. Entre nosotros se presenta la enfermedad en el ganado, por lo general, en forma sobreaguda y los animales caen muertos, como fulminados por un rayo. Por esta razón la terapia no se usa y cuando se aplica es importante administrar el suero temprano y en cantidades suficientes.

#### ESTUDIO SOBRE LOS METODOS DE INMUNIZACION.

Inmunización. El anthrax es una de las enfermedades sumamente serias de los animales, que puede controlarse a través de inmunizaciones de susceptibles animales con preparados biológicos apropiados.

La primera tentativa o prueba de inmunización contra el anthrax fue hecha por Toussaint en 1880. El encontró que la sangre fresca conteniendo B. de anthrax al ser calentada a 55°C. de temperatura durante 10 minutos o añadiendo 1% de fenol, se podría usar sin peligro para la inmunización.

METODO DE PASTEUR. El año siguiente de que Toussaint dio el reporte, Pasteur demostró que los bacilos podían ser atenuados por crecimiento prolongado y a alta temperatura.

Este descubrimiento fue la base del trabajo de inmunización que realizó Pasteur y sus colaboradores Roux y Chamberland.

Se encontró que cuando una cepa virulenta de anthrax crecía en un medio de caldo a la temperatura de 42°C - 43°C. durante 12 días era reducida la virulencia a tal grado que se comprobó que era fatal para ratones blancos y cuyos pero no para conejos. Cuando el crecimiento continuaba a tales temperaturas durante 24 días el cultivo se había atenuado hasta el punto que era fatal para el ratón únicamente; y más tarde se encontró que una vez atenuados

por el crecimiento y altas temperaturas los organismos podían conservar una baja virulencia sin fluctuación con suficiente crecimiento y a la usual temperatura de incubación.

Utilizando estos cultivos atenuados, Pasteur preparó dos tipos de vacunas para inmunización: a) con cultivos recientes en caldo de cepas atenuadas, (tán atenuadas como aquellas que podían matar al ratón fueron las que denominó como "Primera vacuna"; y b) con cultivos similares de las cepas menos atenuadas, (que podían matar al cuyo pero no al conejo) que denominó "Vacuna #2.)

En 1881 en Pouilly-le-Fort, ante una comisión especial Pasteur sometió su vacuna en el renombrado experimento de inmunización contra el anthrax. 50 Ovejas fueron empleadas; la mitad recibió la primera de la vacuna débil y 12 días más tarde la vacuna fuerte. Mientras 25 animales sirvieron de control; 14 días después de la 2a. inyección las cincuenta ovejas fueron artificialmente infectadas. Dentro de las 48 horas hs 25 ovejas de control sucumbieron al anthrax. Aquellas que recibieron la vacunación sobrevivieron.

El método de vacunación por Pasteur ha sido usado en larga escala y con él se logró grandemente controlar la enfermedad.

La vacuna #1 es preparada de rutina (como preparado comercial) y es administrada usualmente en dosis de 1 cc. al ganado, caballos y mulas y en dosis de 0.5 cc. a ovejas y cabras.

Este tratamiento es seguido a los 10 días por la vacuna #2 en dosis similar. Algunas firmas preparan una vacuna especial para ovejas.

Mientras la vacuna de Pasteur ha sido un arma poderosa en el control del anthrax, también presenta ciertas desventajas:

la.- Existe un pequeño porcentaje de animales que mueren como

resultado de la vacunación, especialmente cuando es hecha bajo un campo de condiciones no adecuadas.

2a.- Los animales deben ser tratados 2 veces. Finalmente, desde que la vacuna de Pasteur es en la actualidad un cultivo en caldo, éste frecuentemente se vuelve inerte por autólisis.

Muchas investigaciones han sido hechas sobre ese tema y han continuado hasta el presente tiempo con el objeto de mejorar los métodos de vacunación.

#### METODO DE SOBERNHEIN.

Sobernhein en 1902 recomendó un método de vacunación simultáneo contra el anthrax en el cual 5-10 cc. (usualmente 10 cc) de un suero anti-anthrax fueron inyectados subcutáneamente en un lado del cuerpo e inmediatamente en el otro lado se inyectó 0.5 a 1 cc., (usualmente 1 cc.) de vacuna, correspondiente en virulencia a la número 2 de Pasteur. Este método ha sido ampliamente aplicado con formidable éxito. En 1925 Eichhon y Kelsor modificaron el método de Sobernhein por el de la vacuna de esporas que es igual en virulencia a aquella número 2 de Pasteur y fue usada en combinación con un potente suero anti-anthrax.

Este método también fue modificado más tarde por el uso de una gran cantidad (más de 50 cc.) de suero anti-anthrax, que es dado simultáneamente con una vacuna de una cepa más virulenta (correspondiente a la número 4,) que es altamente virulenta y mata los conejos.

Este tipo de vacuna está restringida generalmente a brotes altamente virulentos.

Método de Chauveau. Chauveau utilizó para inmunizar, una vacuna preparada por una combinación de los métodos de atenuación de

organismos de anthrax. El hizo cultivos que sometió primero a temperaturas entre 43° y 47°C., y luego los dejó a los 37°C. hasta que se formaron esporas; finalmente él calentó los cultivos a temperaturas de 80°C - 84°C. Este método no ha sido ampliamente usado.

#### Inmunización con Agresinas.

Bail reportó que él podía inmunizar ovejas contra el anthrax aplicando subcutáneamente una pequeña cantidad de fluido edematoso procedente de un animal muerto. Las agresinas de anthrax fueron preparadas de fluidos edematosos de animales muertos, obteniéndolos libres de gérmenes por filtración. El resultado del uso de este producto en el campo no fue suficientemente satisfactorio porque la manufactura de agresinas no ha sido continua.

#### Vacunación intradérmica.

Borcsika trabajó sobre el papel de la piel en las infecciones del anthrax y su método de inmunización por inyecciones intracutáneas ha abierto un interesante campo en la profilaxis.

En la pasada década se trabajó experimentalmente sobre la vacunación intradérmica contra el anthrax y se ha demostrado ser uno de los mejores métodos.

En este método se usa vacuna de esporas de gran virulencia, (correspondiente a la No. 2 de Pasteur) intradérmica. Se aplica la inyección al ganado en el pliegue de la cola, pero también puede hacerse en cualquier otra región de la piel.

Vacuna de esporas. La vacuna de esporas es dada en 1 o 2 inyecciones a intervalos de una semana; la virulencia de las vacunas esporuladas está señalada desde los trabajos de Pasteur sobre la atenuación del germen carbuncoso y las esporas que la forman

tienen diversos grados de virulencia.

Por ejemplo, una esporovacuna No. 1 matará al ratón; la No. 2 al ratón y cuyo, la No. 3 cuyos y raramente conejos y la No. 4 conejos. En algunas formas de vacuna de esporas atenuadas se le agrega alumbre como también a las vacunas esporuladas vivas.

También se han preparado bacterinas carbuncosas, bien con cultivos totales o con gérmenes lavados procedentes de medios sólidos, destruyéndolos en ambos casos con agentes químicos, especialmente formalina. Estas vacunas de bacterinas se han empleado en aquellas regiones donde no era aconsejable emplear vacunas vivas.

Sin embargo, los resultados experimentales señalan que la inmunidad producida por las bacterinas no es tan fuerte como la producida por las esporovacuna.

Viljoen, Cuesor y Fourie en 1928, encontraron que una vacuna estándar descrita a continuación dio resultados satisfactorios en Sur Africa; condiciones: se selecciona una cepa de *B. anthracis* atenuada por crecimiento a una temperatura de 42°C. durante no menos de 30 días; ésta debe matar a los cuyos pero no a los conejos.

Estos organismos son dejados en crecimiento a una temperatura de 37° hasta que todas las células han esporulado.

Se hace una emulsión de esporas y entonces una parte de emulsión es mezclada con 2 partes de glicerina.

Esto constituyó la vacuna esporulada.

Los exámenes preliminares son hechos en conejos y cuyos como sigue:

Un conejo	recibe	una	inyección	subcutánea	0.1 cc. de emulsión	
"	"	"	"	"	"	0.01 cc. de emulsión
"	cuyo	"	"	"	"	0.01 cc. " "
"	"	"	"	"	"	0.001 cc. de emulsión

La vacuna es considerada efectiva y segura si los dos cuyos mueren y ningún conejo muere. Como adición, para mayor seguridad y eficacia la vacuna se prueba en una oveja, la cual deberá ser inoculada con una cepa muy virulenta.

Los laboratorios Fort Dodge están usando para su vacuna una cepa atenuada procedente de bovinos y sembrada en agar a 60°C. Los cultivos son suspendidos en solución salina glicerizada (40% de glicerina.) La concentración final de los bacilos es de 2 billones de esporas por cc. La vacuna es precipitada por alumbre.

En las esporovacunas el número de esporas por cc. varía, pudiendo contener 300,000; 600,000; 1.200,000; 10, 15 millones o aun 2 billones de esporas por cc. El número de esporas por cc. varía con el cultivo empleado. La cantidad usual administrada al ganado es 1 cc. En el Africa del Sur el número de esporas por cc. es usualmente 600.000 a 1.200.000.

Mazzuchi en 1931 reportó una vacuna que llamó "Carbazoo" y consiste en una suspensión de bacilos virulentos en solución de Saponina. Los bacilos y esporas están localizados en la nixtura. Inyectados por vía subcutánea penetran lentamente en los tejidos y por consiguiente producen una reacción lenta pero al mismo tiempo duradera. Este método es muy usado en Italia y la vacuna se encuentra en el comercio de este País.

Hruska y Mazzuchi sostuvieron que las cepas virulentas en saponina podían ser usadas para inmunizar los animales contra el anthrax.

Mazzuchi enfatizó esto como una de las principales ventajas en el uso de la saponina.



Experimentadores en Africa del Sur encontraron que la reducción en virulencia producida por medio de la saponina no es aconsejable en la práctica y que las cepas virulentas tratadas con saponina podían matar a ovejas y cabras fácilmente.

La cantidad de saponina que originalmente aconsejaron Hruska y Mazzuchi causaron severas reacciones.

Los experimentos del Laboratorio, en ovejas demostraron que la saponina mejoraba la inmunidad. Esto mismo ocurrió al usar una copa no encapsulada y avirulenta. Las esporas fueron suspendidas en una solución salina glicerinada (50% de glicerina) con 0.5% de saponina y administrada en dosis de 1 cc al ganado. Las cepas que ellos usaron en Africa del Sur para este tipo de vacuna fueron menos severas que aquellas que se usaron en las vacunas de esporas naturales, porque la acción de la saponina en la inmunidad parece ser más importante que su acción en la reducción de la virulencia. La seguridad de la vacuna ha sido mejorada por el empleo de la saponina con cepas débiles.

Las cepas virulentas de anthrax cuando se les agrega saponina retienen mucho de su virulencia y no deben ser usadas como vacuna. No más que 0.5 a 1% de saponina deben ser usados. Esta cantidad fue usada más tarde por los franceses. La dosis para ganado bovino es de 1 cc. y para ovejas de 0.5 cc.; cuando se usan aquellas concentraciones de saponina. Se sugiere que la saponina debe ser usada con cepas débiles para mejorar la inmunidad más bien que con cepas fuertes para reducir la virulencia.

En Africa del Sur se está usando una vacuna procedente de una copa avirulenta y no encapsulada. La vacuna se prepara sembrando una suspensión de cultivo en caldo de 24 horas sobre agar con caseína

hidrolizada. Este medio se prepara así, se mezcla el hidrolizante, la levadura, el agar y el agua. El medio es muy simple de preparar. En este medio la esporulación de los bacilos es completa después de 48 horas y el lote es cosechado al tercer día lavándolo con solución salina fisiológica. Se le añade 2 veces en peso una cantidad de glicerina. El lote debe ajustarse a contener  $6 \times 10^8$  de esporas en suspensión por cc. El poder inmunizante se prueba en cuyos. Antes de usar la vacuna, se diluye a 1/50 con 50% de solución salina glicerinada y se le agrega 1/8% de saponina Evans o un 1/4% de saponina Merck. La dosis de la vacuna que se usa es de 1 cc. conteniendo cerca de 10 millones de esporas.

El B. de anthrax ha sido considerado como una excepción de la regla general porque los bacilos virulentos, recientemente aislados forman colonias muy rugosas. Muchos investigadores han observado que se pueden obtener colonias lisas avirulentas por medio de los diferentes métodos de atenuación.

Este cambio en virulencia y estructura de las colonias del B. anthracis no se compara a la variación que se observa de la forma lisa o rugosa en otros gérmenes patógenos. En el grupo typhoso, por ejemplo, la transición en la forma lisa es acompañada por un cambio más o menos brusco en virulencia, de tal manera colonias muy virulentas, de virulencia intermedia y avirulentas pueden encontrarse en la misma placa, éstas se caracterizan por el grado de lisura y rugosidad. Generalmente las lisas son las más virulentas y las más rugosas son avirulentas. No obstante en el caso del anthrax, un cultivo virulento es rugoso, después de un período de crecimiento a  $42^{\circ}\text{C}$  una disminución en virulencia probablemente se demuestra en el cultivo con una apariencia menos rugosa.

A medida que la atenuación prosigue, la apariencia rugosa se modifica considerablemente y eventualmente colonias lisas pueden aparecer entre las rugosas. Estos hechos han sido generalmente aceptados; pero la mayoría de los autores creen que no hay una diferencia notable de virulencia entre las colonias rugosas y lisas de la misma placa. Esto es en colonias de la misma generación. La apariencia de las formas lisas es en cierto modo un índice de atenuación. Es por esto que no ha sido posible encontrar colonias completamente virulentas en una placa donde colonias lisas empiezan aparecer durante la atenuación.

Todos los tipos de colonias en un momento dado de atenuación aparecen tener el mismo grado de virulencia.

Esta es una diferencia bastante notable entre los tipos de disociación hallados en los organismos como la *S. typhosa* y en el tipo de variación descrito en el Anthrax.

Atenuación del B. anthracis. El *B. anthracis* puede atenuarse por la adición de cloruro de calcio al medio, lo cual debe hacerse después de la esterilización; por el contrario la adición de 2 partes por mil de oxalato de sodio sirve para mantener la virulencia inicial.

El tiempo necesario para la atenuación del *B. anthracis* a 42.5° C. depende del contenido de calcio en el medio. En el caldo ordinario, donde el agotamiento del calcio varía con el grado de alcalinidad, el tiempo requerido para la atenuación es irregular. Es sabido que el calcio en el medio de cultivo de caldo es agotado como una consecuencia de la precipitación del fosfato tricálcico en un medio alcalino. Algunas veces la atenuación se obtiene después de 20 días; en otros casos, los cultivos permanecerán

virulentos para los cuyos después de 40 días.

En el caldo al cual se agregó 0.1 parte por 1000 de cloruro de calcio, la atenuación es obtenida después de 15 días. En un caldo al cual se ha suplementado con 2.5 por 100 de oxalato de sodio neutro, la virulencia permanece igual aun después de 40 días, (baja después de 3 meses.)

Aumentando la temperatura se consigue acelerar la atenuación del B. anthracis en el caldo adicionado de calcio. A los 44°C. la atenuación del B. anthracis se obtiene después de 60 horas; por el contrario, los controles requieren 75 horas y cuando el medio es suplementado con oxalato de sodio, se necesitan 86 horas.

Para empezar la atenuación del bacilo se usó una cepa virulenta cultivada en agar, la cual se pasó por un cuyo; después de muerto el cuyo, se empleó la sangre del corazón para la inoculación de todos los medios.

Este experimento se hizo en una serie de 3 tubos conteniendo 5 cc. de caldo nutritivo, a un tubo de la serie se le añadieron 10 gotas de una solución de oxalato de sodio neutro al 2.5 por 100 (caldo oxalatoado 2.5 por 1000;) el segundo tubo recibió 10 gotas de solución salina fisiológica más una gota de cloruro de calcio, una parte por mil (caldo calcificado 0.1 por 1000.) Después de la incubación a las temperaturas y tiempos determinados se trasplantó el cultivo en agar y se comprobó su atenuación en cuyos.

Métodos de preparación de la vacuna ordinaria de dosis única esporulada.- Selección de la cepa. La atenuación de cepas de anthrax por el método de Pasteur es tedioso y a menudo insatisfactorio, porque aunque es fácil atenuar la cepa, es difícil que éstas mantengan determinado nivel de virulencia.

Hay sin embargo suficiente atenuación estable en cepas que pueden ser usadas para la producción de vacunas. La cepa Boshoff ha dado buenos resultados. La de Carbazoo Marlander y Carbazoo Lederle, son también muy buenas para la producción de vacuna. Las suspensiones de esporas preparadas de algunas de estas cepas permanecen marcadamente estables al nivel de la virulencia de las cepas iniciales.

Características de las cepas para vacunas.

Las cepas aconsejables para la preparación de vacunas deben crecer y desarrollarse ampliamente en agar nutritivo. Los bordos deben ser ligeramente rugosos y la superficie lisa y brillante, lo cual indica la presencia de muchos bacilos capsulados. Se usa el siguiente medio:

Carne: 500 gramos

Peptona Merck: 10 gramos

Cloruro de sodio: 5 gramos

Fosfato ácido de sodio ( $\text{Na}_2 \text{PO}_4 \text{H}$ ): 1 gramo

Agar: 25 gramos

Agua: 1000 cc.

P.H 7. 4

Una buena esporulación parece estar asociada con un crecimiento vigoroso más bien que con crecimiento retardado. Antes de usar cada lote de medios debe ser testado por su habilidad para dar un vigoroso crecimiento de la cepa de la vacuna. (La omisión de la peptona no favorece la esporulación pero sirve únicamente para retardar el crecimiento.)

La cepa se suspende en caldo nutritivo de tal manera que dé una suspensión bastante densa. Esta suspensión se usa en la

inoculación de los frascos.

Anteriormente se usaba como inóculum un cultivo de 24 horas; pero esta técnica se desechó a causa de que el medio líquido tiene de a dar formas variantes e indeseables.

Crecimiento. Los frascos son incubados a 37.5° C. y a 38° C. Esta temperatura debe estar cuidadosamente ajustada, bajas temperaturas afectan la esporulación adversamente. Las cepas donde la esporulación se obtiene fácilmente a 37.5° C. pueden mostrar solamente masas de gránulos metacromáticos a los 35° C. o a los 36° C.

Después de 2 días, la superficie del crecimiento resalta y es mucóide y al hacer un frotis se verán en el microscopio un gran número de bacilos capsulados, así también una buena cantidad de esporas.

Más tarde la apariencia mucóide se pierde gradualmente, mientras la proporción de esporas aumenta. La esporulación es completa a los 5 días y el crecimiento listo para lavarse. Si la esporulación a este tiempo es pobre como ocasionalmente puede suceder el lote de cultivos debe desecharse porque de ellos nunca se obtienen buenas vacunas.

Prueba. Cada frasco produce de 80 a 90 cc. de suspensión glicerinada de esporas.

2	conejes	reciben	cada	uno	0.1	cc.	subcutáneamente	y	deben	sobrevivir
3	cuyos	"	"	"	0.1	cc.	"	"	"	morir
3	"	"	"	"	0.01	cc.	"	"	"	"
3	"	"	"	"	0.001	cc.	"	"	"	"

Los cuyos deben pesar 500 gramos y ser cuidadosamente seleccionados. En la interpretación de estos resultados el tiempo de vida después de la inoculación de los animales debe ser tomado en

consideración. Si todos los cuyos mueren dentro de 48 a 72 horas o si todos mueren cerca del mismo tiempo la vacuna será demasiado virulenta. La diferencia en la dosis de 0.1 a 0.001 cc. de la suspensión madre debe mostrar un efecto marcado. Los lotes de cultivos en los cuales 0.1 cc. a 0.001 cc. mata a cuyos en 24 a 72 horas son desechados. Aun si los conejos sobreviven. La muerte de los cuyos puede suceder dentro de 3 a 7 días después de la inoculación, ocasionalmente un cuyo puede sobrevivir. Cuando acontece ésto no debe considerarse como mal signo. Si algún conejo muere de anthrax el lote es desechado.

Generalmente la vacuna se prueba para seguridad e inmunidad en ovejas y cabras. Las ovejas reciben 20 cc. y se prueba la inmunidad 3 semanas más tarde, examinándolas para la inmunidad con una cepa virulenta.

#### VACUNAS QUE SE ENCUENTRAN EN EL COMERCIO.

##### (Inmunización contra el Anthrax con Rayo-carbón (marca Life.)

Esta vacuna está constituida por esporas vivas atenuadas del carbón bacteridiano, absorbidas con gel de aluminio, producto químico altamente purificado, que actúa regulando la lenta absorción de la vacuna en los tejidos, produciendo el mismo efecto que si se administraran dosis repetidas.

La vacuna debe ser aplicada sólo a animales sanos y no fatigados, nunca a animales con fiebre o extenuados por viajes largos o ejercicios forzados.

La inmunidad en los animales comienza aproximadamente desde el quinto día y se hace completa alrededor del décimo, para durar por lo menos 1 año.

Se pueden vacunar terneros desde los 6 meses en adelante. La reacción de la vacuna consiste en un pequeño aumento de la temperatura en el segundo día de la vacunación y, a veces, se presenta un pequeño tumor en el lugar donde se puso la inyección.

La vacuna se emplea subcutáneamente en la región del cuello en dosis de 1 cc. para bovinos.

En el sitio donde se ponga la inyección se aplicará algún desinfectante. Los frascos deben conservarse en refrigeración y el contenido de ellos debe ser utilizado en el mismo día, en caso contrario, el sobrante deberá quemarse.

#### Vacuna de Esporas Antianthrax No. 4.

Meridional V.23.(Marca Mulford.)

La vacuna de esporas antianthrax Meridional V.23 marca Mulford es una vacuna muy potente, puede infectar a los ratones blancos, cuyos y conejos, pero no a las ovejas.

La vacuna se prepara de un grupo de B. anthracis de probada patogenicidad, sembrado en agar y suspendido en solución salina reguladora.

La vacuna debe usarse en dosis de 2 cc. administrada subcutáneamente en el cuello. Aunque la inyección de 2 cc. de la vacuna es suficiente para conferir una protección amplia; a veces, en ciertos casos, puede ser necesario usar el método de vacunación doble, o sea la inyección de una segunda dosis de la misma vacuna, con un intervalo de 7 a 10 días después de la dosis inicial. Esta segunda dosis debe ser de 4 cc.

Nunca debe usarse más tarde la parte sobrante de la vacuna que pueda haber quedado en el recipiente en donde se ha envasado.

La vacuna debe guardarse en un lugar fresco.



Vacuna anthracis Esporulada (Charbonel) Marca Cutter.

Consiste en una suspensión de esporas de Anthrax en atenuación número 4 absorbidas en hidróxido de aluminio. A causa de la absorción en hidróxido de aluminio, el producto final no demuestra el grado de virulencia comúnmente asociado con las vacunas de esporas en atenuación número 4. Por lo tanto, la vacuna es muy efectiva cuando se inyecta subcutáneamente para la inmunización del ganado altamente susceptible como los caballos y las ovejas.

El charbonel es dosificado en inyecciones de 2 cc. para el ganado, aplicadas debajo de la piel al frente o por detrás de la paleta o espaldilla.

La vacuna establece inmunización hasta las 2 o 4 semanas de ser aplicada y dura de 6 meses a 1 año.

Vacuna Esponular Antianthrax, Carbazoo (Marca Lederle.)

Esta vacuna es una suspensión de esporas viables de Bacillus anthracis en saponina.

Se administra al ganado en dosis de 1 cc. por la vía subcutánea inmediatamente delante del hombro en la piel floja del cuello o del hombro, o por la vía subcutánea en el repliegue caudal.

Vacuna Australina contra el Anthrax.

Esta vacuna es vendida por la Casa Franklin Scrum Company y fue descubierta y perfeccionada por John Mc Garvie Smith hace 50 años. Se dice que esta vacuna confiere inmunidad de por vida al ganado y que no es peligrosa ni para el hombre ni para los animales, como sucede con las otras vacunas contra el Anthrax, que por su alta virulencia, fuera de que su período de inmunización y protección es muy corto, sí ofrecen peligro.

Está hecha de bacilos anthracis virulentos atenuados, con el resultado de que se pueden emplear las esporas atenuadas.

Se usa en una sola dosis de 1 cc. aplicada subcutáneamente en la tabla del cuello del animal, solo en casos necesarios puede repetirse la vacunación, a los 3 años.

Vacuna Antianthrácica Esporulada No. 1, precipitada con Alumbre. (Marca Ford Dodge.)

Esta vacuna contiene esporas dotadas de alguna virulencia y está precipitada con alumbre.

Dosis: 2 cc. administrados subcutáneamente.

Quémese el recipiente y todo el contenido sobrante de la vacuna.

Vacuna Pasteur. De ésta se ha hablado bastante.

Preguntando a algunos Veterinarios sobre sus experiencias, ellos han manifestado que han usado las vacunas de las marcas comerciales descritas y la eficacia de ellas se logra al ser aplicadas en el tiempo debido a la inmunización y manteniendo ésta regularmente, lo cual ayudará a reducir las pérdidas de animales e incrementará la industria lechera y todo lo referente al ganado de nuestro País.

En el Ministerio de Agricultura y Ganadería se vendieron durante el año de 1.955 y de Enero a Mayo de 1.956 la cantidad de 86.156 dosis de vacunas de las diferentes marcas: Cutter, Life, Mulford, Pasteur, Fort Dodge y Lederle. Además en varias Farmacias de la Capital y de los Departamentos se venden vacunas de las citadas marcas y de otras.

Por los resultados de exámenes de Anthrax hechos en el Laboratorio de la Dirección General de Ganadería, puede observarse que los casos proceden de las diferentes zonas del País.

Enero 1.951

(Dr. Molina A.)

Rafael Guirola (Santa Tecla)

4 años

Bovina hembra

Investigación sanguínea de corte de oreja

Tinción Gram y Tinta china

Se encontró Bacillus Anthracis (Anthrax)

oOo

Enero/31/1.951

(Dr. Molina A.)

José García Velásquez

3 años (hembra bovina criolla)

Inv. general (sangre de corazón)

Hda. Casa Mata, San Miguel

Tinción Gram

Se encontró Bacillus anthracis (Anthrax)

oOo

2 de Febrero de 1.951

(Dr. Molina A.)

Pantaleón Benítez

10 meses (hembra bovina criolla)

Inv. Bacteriológica (Inv. general) corte de oreja, bazo, hígado,  
sangre, pulmón etc.)

Hda. Casa Mata, San Miguel

Tinción Gram. Tinta china

Se encontró Bacillus anthracis (Anthrax.)

9 de Febrero de 1.951

Rafael Meza Ayau

hembra, 1 año, B. Swizo, Bovina

El Cabanal, Colón, La Libertad

Inv. general, Frotis sanguíneo, corte de bazo, hígado y riñón

Tinción Gram, M. Grunwald y Tinta china

Se encontró *Bacillus anthracis* (Anthrax.)

oOo

10. de Marzo 1.951

Ricardo Abrego

Bovina, hembra, 2 meses

Hda. La Normandía, Jiquilisco

Inv. general, corte de oreja

Tinción Gram

Se encontró *bacillus anthracis*

oOo

26 de Abril de 1.952

Luis Gutiérrez

Hda. La Cabaña, Usulután

Bovina, hembra, 3 años, criolla

Se encontró el *Bacillus anthracis*

oOo

5 de Julio de 1.951

Ministerio de Agricultura y Ganadería

Establos La Ceiba

Bovino, macho,  $3\frac{1}{2}$  años, Brown Swizo

Tinción May Grunwald

Se encontró *Bacillus anthracis*.

REFERENCIAS.

Merchant, I.A. Bacillus anthracis. Veterinary Bacteriology  
The Iowa State College Press, Ames Iowa. 1.946.

Kelser, Raymond. Bacillus anthracis. Manual of Veterinary  
Bacteriology. The Williams & Wilkinns Company. 1948.

Annals of the Institute of Pasteur 81:424-9 (1.951)

Sterne, Max Ondersteport Journal of Veterinary Science and  
Animal Industry. 21: (1) 41-43. (1.946.)

Annals of the Institute of Pasteur 56: 535-83.

Sterne, Max. Ondersteport Journal of Veterinary Science and  
Animal Industry 12: (2) 279-302. (1.939.)

Sterne, Max. Ondersteport Journal of Veterinary Science and  
Animal Industry. 12: (1) 9-18. (1.932.)

Sterne, Max. Ondersteport Journal of Veterinary Science and  
Animal Industry. 13: (2) 309-312. (1.939.)

Sterne, Max. Ondersteport Journal of Veterinary Science and  
Animal Industry. Variation in Bacillus anthracis.  
8: (2) 271-349. (1.937.)

Tesis doctoral del Dr. Carlos Alfredo Alfaro.