

El B. C. G. en el Uruguay

CATORCE AÑOS DE EXPERIENCIA SOBRE PASAJES CONTINUADOS EN PAPA - BILIS - GLICERINADA

Por ANGEL TORTORELLA

Jefe del Laboratorio del Dispensario Calmette, servicio de A. Antituberculosa del Ministerio de Salud Pública.

Desde la fundación del Servicio, en el año 1927, hasta el año 1932, la conservación de la cepa de B. C. G. se efectuó por pasajes en papa-glicerinada, repicándola cada tres semanas durante diez pasajes sucesivos en este medio; después de estos diez pasajes eran repicados dos veces seguidas en papa-bilis-glicerinada para volver nuevamente a papa-glicerinada. Las vacunas preparadas, siempre procedieron de cultivos de velos de papa-glicerinada en medio sintético de Sauton.

Después del accidente de Lübeck, Calmette remitió un folleto a los laboratorios encargados por las autoridades sanitarias de la preparación y distribución de la vacuna B. C. G., con las correspondientes instrucciones: técnica de los cultivos del B. C. G.; preparación de las emulsiones vacinales y controles de la no virulencia; recomendando especialmente ponerlas en práctica para evitar toda sorpresa y todo accidente.

Técnica seguida para los cultivos del B. C. G. — Calmette recomendaba mantener los cultivos de B. C. G. en papa-bilis-glicerinada, re-

picándolos sucesivamente cada quince días en este medio. Para la preparación de la vacuna, se repicarían a papa-glicerinada y los velos obtenidos del cultivo de quince días eran sembrados en medio de Sauton. Con los cultivos de esta procedencia se prepararían las emulsiones vacinales.

Este procedimiento se adoptó en este Laboratorio, en el año 1932, utilizando hasta el presente; de manera que en catorce años lleva 330 pasajes aproximadamente en papa-bilis-glicerinada.

Durante este periodo no fué observada ninguna variante en el aspecto y carácter biológico del B. C. G. que hiciera sospechar una modificación de su virulencia, en el sentido de comprometer su valor antígenico como vacuna.

Por otro lado, de existir, ya las autoridades del Instituto Pasteur lo hubieran notado y habrían comunicado las modificaciones pertinentes.

Experiencias realizadas en el propio Instituto Pasteur, en el año 1940, por K. O. Streng, utilizando cepas de B. C. G. de 554 pasajes continuados por papa-bilis-glicerinada, y otra cepa, que después de 119 pa-

sajes en papa-bilis-glicerinada se mantuvo cinco años y medio en papa-glicerinada, no mostraron diferencia alguna probatoria de una desvitalización del B. C. G. por pasajes sucesivos en papa-bilis. Esto confirma los trabajos realizados en nuestro Laboratorio, que demuestran que el B. C. G. se mantiene inmutable como bacilo vacuna.

Preparación de la vacuna. Fase de la homogeneización del B. C. G. — La homogeneización del B. C. G. por batido a mano, para la preparación de las suspensiones vacunales, para algunos puede desvitalizar el germen. Manifestaremos cuáles es la manipulación a que son sometidos los cultivos para la preparación de la vacuna.

Al comienzo de las actividades del Laboratorio, el B. C. G. enjuagado y pesado, se distribuía en frascos de 500 gramos, de boca ancha con tapón de vidrio esmerilado, conteniendo en su interior perlas de vidrio de 5 a 7 milímetros de diámetro. Estos frascos, colocados en un agitador cuna, eran movidos por motor eléctrico durante diez minutos, hasta desgaste y caída de las perlas de vidrio que podían incorporar polvo de vidrio a la vacuna; por ello se trajeron de París, perlas de acero cromado de 5 milímetros de diámetro, recomendadas y utilizadas por Calmette para el agitado del B. C. G.. Simultáneamente se cambió el agitador mecánico por el a mano. Este proporcionada las siguientes ventajas: evitaba frecuentes roturas de frascos; los movimientos, de bruscos, se tornaban moderados; el mo-

vimiento de vaivén del agitador cuna se transformaba el movimiento de rotación, deslizando el cultivo por toda la pared interior del frasco, se limitaban los movimientos a voluntad y al cabo de cinco minutos se obtenía la total disociación de los grumos de cultivo.

Hasta el presente hemos seguido esta técnica: cada frasco de 500 gramos contiene de 150 a 200 gramos de perlas de acero cromado de 5 milímetros de diámetro, cantidad que la estimamos suficiente, sin ser excesiva, según se trate de homogeneizar cuatro y ocho gramos de B. C. G.. Ahora bien, para demostrar que esta operación no influye en la vitalidad de la vacuna, el suscripto realiza con frecuencia controles de la misma, por siempre en papa-glicerinada y en medio de Petragnani, utilizando comparativamente: vacunas de reciente preparación, de veinticuatro horas, de ocho días y de quince días, conservadas en nevera y a temperatura ambiente, con los siguientes resultados: en papa-glicerinada con 1/10 c.c. de vacuna con cinco miligramos de concentración de B. C. G. por c.c. de vacuna se obtienen cultivos aparentes en toda la superficie del medio entre los ocho a diez días. Estos adquieren su relieve característico de vegetación y desarrollo a los quince días de estufa. Siembras practicadas con vacunas de veinticuatro horas, y de ocho días de preparadas y conservadas en nevera dan igual desarrollo, y éste aparece algo más demorado con vacunas de veinticuatro horas, ocho y quince días dejadas a temperatura ambiente. En medio de Petragnani, sembrado e iguales condiciones, se opera el crecimiento a partir de los siete días

para adquirir su desarrollo y extensión con las distintas vacunas, ya sean éstas conservadas en nevera o a temperatura ambiente.

Calmette dió mucha importancia a la conservación de la vacuna después de preparada, recomendando especialmente que no se emplearan vacunas de más de diez días de elaboradas, porque a medida que se aleja del momento de la preparación, la vacuna ligeramente va perdiendo actividad por muerte de gérmenes; ésta es la razón de la desvitalización de la vacuna.

Este servicio felizmente prepara semanalmente la vacuna y cubre las deficiencias de la vacunación, cuando se inicien con series próximas a vencimientos, con la nueva serie que se remite, desconociendo el Laboratorio si todas las personas encargadas de la vacunación ajustan su conducta a las instrucciones respectivas.

Control de innocuidad y actividad de la vacuna. — Desde 1927 a 1930 los controles de los cultivos de B. C. G. o las vacunas preparadas con esas cepas, se practicaron en cobayos, utilizando dosis comprendidas entre 5 y 50 miligramos de B. C. G., inoculados por vía subcutánea, intraperitoneal, intrapleural, intravenosa, intracraneana, cojinete planter y vía digestiva. Desde 1930 hasta el año 1932, sistemáticamente, de cada serie preparada, se inocularon dos cobayos, uno por vía intraperitoneal y otro por vía subcutánea con dosis de 25 miligramos de B. C. G..

Desde 1932 hasta el presente, de cada serie preparada de vacuna, se inoculan dos cobayos por vía intraperitoneal con dosis de 5 a 10 mi-

ligramos de B. C. G.. Los animales permanecen un año en observación; cumplido este tiempo son autopsiados, conservándose en formol los pulmones, hígado, bazo y ganglios mesentéricos, con los cuales se practican cortes histológicos. Igualmente se procede con los cobayos que mueren en el curso del período de observación a causa de alguna enfermedad intercurrente; autopsiados, se observan las lesiones que tienen relación con la inoculación del B. C. G., cuando ellas se hacen presentes.

De las observaciones realizadas a través de catorce años de un trabajo sistematizado en lo que respecta a la regularidad de la inoculación correspondiente a cada serie de vacuna preparada, como también a la igual dosis empleada y vía utilizada, podemos ofrecer los siguientes datos ilustrativos para apreciar cómo el B. C. G., a pesar de los pasajes sucesivos de papa-bilis-glicerinada, conserva su facultad de producir regularmente lesiones. En el año 1932 se inocularon 102 cobayos correspondientes a 51 series de vacuna, y sacrificados al término de un año de la inoculación, se observan en veinte de ellos, abscesos intraperitoneales que varían en tamaño, desde un grano de maíz hasta el de una avellana, ubicados preferentemente en el epíplón, coexistiendo con esta lesión, en algunos de ellos, adherencias peritoneales con algún órgano de la cavidad peritoneal. En el año 1938, de 102 cobayos, correspondientes a 51 series de vacuna, y sacrificados al término de un año de la inoculación, igualmente se observó en veinte animales lesiones de las descriptas anteriormente. Por último, en el año 1944-45, de 102 co-

bayos, correspondientes a 51 series de vacuna, sacrificados al año de inoculados, observamos en treinta y dos lesiones de igual significación de las descriptas para los años 1932 y 1938.

Como dato complementario, debemos agregar que en cobayos inoculados de un mes, muertos durante el invierno a consecuencia del frío, siempre hemos comprobado reacción epiploica con formación o iniciación de pequeños abcesos. En los frotis al examen microscópico reveló numerosos bacilos ácido-alcohol-resistentes, agrupados con los elementos linfocitarios que superan a los observados en los controles microscópicos de la vacuna. Esto demuestra una multiplicación de los mismos, antes que el organismo se desembarrace de ellos para ir a la normal re-integración, que es variable según el comportamiento reaccional del sujeto, como lo atestiguan los hallazgos de las autopsias en los que llegan a sobrevivir un año, en los cuales se hallan lesiones por el B. C. G., en un 20 a 30 %. Estos controles demuestran dos cosas: 1º) que la vacuna inoculada es innocua porque no produce lesiones evolutivas tuberculosas; 2º) que la vacuna no se encuentra desvitalizada por cuanto un germen muerto no sería capaz de producir lesiones específicas que se revelan.

Investigación de la alergia en los cobayos controles de vacunas que permanecen un año en observación antes d ser sacrificados. — En varias oportunidades, y con fines experimentales, hemos determinado la marcha de la alergia en cobayos en observación para juzgar la innocuidad de la vacuna. No vamos a men-

cionar todas las pruebas realizadas, pero si resumiremos la última efectuada hace pocos días, que nos parece demostrativa para desvirtuar las apreciaciones de desvitalización de la vacuna por pasajes continuados en papa-hilis-glicerinada y por las manipulaciones del batido a que se somete el B. C. G. en la preparación de la vacuna.

Hemos dispuesto de 48 cobayos distribuidos en doce grupos, correspondiendo cada uno a cobayos de uno hasta doce meses de inoculados.

Recibe cada cobayo 1/10 c.c. de tuberculina bruta diluida 1 en 10, por vía intradérmica en la región media superior del abdomen. Las observaciones se practicaron a las 24, 48 y 72 horas con el siguiente resultado: los cobayos correspondientes a 1, 2 y 3 meses de inoculados, presentan reacción positiva a partir de las 24 horas, con infiltración edematoso, pápulas entre 10 y 15 milímetros de diámetro con 2,8 a 5 milímetros de espesor sobre la normal de 1,6 a 1,8. La reacción papulosa va decreciendo a partir de las 48 horas, manteniéndose el infiltrado a las 72 horas y en algunos con necrosis.

En el lote de los que llevaban cuatro meses de inoculados, tres dieron reacción positiva de igual significación que los anteriores, el otro una pápula de 6 milímetros de diámetro con 2,5 de espesor sobre lo normal de 1,6.

En aquellos de cinco meses: uno negativo; dos con pápulas de 6 milímetros de diámetro con 2 a 2,5 de espesor sobre la normal de 1,6; los restantes: pápula de 11 milímetros de diámetro con 3 de espesor sobre la normal de 1,5.

El lote de seis meses: pápula de 7 milímetros de diámetro con 2,5 de espesor sobre la normal de 1,6.

El lote de siete meses: uno negativo; los restantes con pápulas de 8-9 milímetros de diámetro con 2 a 3,5 de espesor sobre la normal de 1,8.

El lote de ocho meses: pápula de 6 a 10 milímetros de diámetro con 2,7 a 4 de espesor sobre la normal de 1,6.

El lote de nueve meses: tres con pápula de 6 a 8 milímetros de diámetro con 2,6 a 2,8 de espesor sobre el normal de 1,6 a 1,8. El restante: pápula de 9 milímetros de diámetro con 3,7 de espesor sobre la normal de 1,8; este cobayo se sacrificó y se comprobaron dos abscessos en el epiplón; frotis de pus mostraron numerosos bacilos agrupados.

En lote de diez meses: pápula de 6,3 a 9,4 milímetros de diámetro con 2,6 a 2,8 de espesor sobre la normal de 1,6 a 1,9.

El lote de once meses: uno negativo; dos con pápula de 7 a 9 milímetros de diámetro con espesor de 3 sobre la normal de 1,7 a 2. El otro con pápula de 12,4 milímetros con espesor de 3,8 sobre la normal de 1,7; se sacrificó, observándose como única lesión una adherencia del epiplón al borde inferior del hígado.

El lote de doce meses de inoculados: uno con pápula de 7 milímetros de diámetro con 4 de espesor sobre la normal de 1,7. Sacrificado se observa una adherencia de la serosa de la gran curvatura del estómago a la cara inferior del hígado en un área de 2 a 3 centímetros de diámetro.

Los restantes con pápula de 6 a 10 milímetros de diámetro con 2,8-2,9

de espesor sobre la normal de 1,6.

El Dr. Julio Lorenzo y Deal, conjuntamente con los estudiantes de medicina Julio Lorenzo Ibarreta, Juan Gomensoro y Venus González Panizza, pusieron a mi disposición un lote de conejos con los que estaban realizando inoculaciones experimentales de B. C. G..

De este lote sacrificamos a dos a los veinte días de inoculados con 25 miligramos de B. C. G. por vía intravenosa. Presentaban lesiones nodulares en la superficie del pulmón e hígado. El examen histológico de pulmón e hígado, reveló en el pulmón numerosas infiltraciones linfocitarias con la presencia de numerosas células gigantes y las mismas lesiones en el hígado, pero de menor grado.

Conejos sacrificados a los tres meses de la inoculación de 25 miligramos de B. C. G. por vía intravenosa, no presentan lesiones macroscópicas de sus parénquimas, pero en los cortes histológicos muestran infiltrados celulares con pocas células gigantes, caracteres éstos similares a los descriptos por Calmette en inoculaciones experimentales.

Investigación de los anticuerpos (Sensibilizatríz). — Conejos inoculados con 25 miligramos de B. C. G. por vía intravenosa en la vena marginal de la oreja el 17-VI-46, empleando 2,5 c.c. de B. C. G. — N. R. dosificada a 10 milligramos el c.c., y sangrados a los 72 días, revelan la presencia de anticuerpos específicos en la suerorreacción de fijación del complemento practicada con antígeno de bacilos ácido-alcohol-resistentes, obteniéndose 160 unidades de anticuerpos.

Conclusiones

1º — El B. C. G. es un bacilo immutable y por tanto considerado como raza definida.

2º — El mantenimiento por pasajes sucesivos en papa-bilis-glicerina da no influye en su vitalidad; ni en su poder antigénico.

3º — Las vacunas preparadas con B. C. G. mantenido en papa-bilis-glicerinada, demuestran actividad.

expresada por: a) cultivos; b) inocuidad con inoculación experimental; c) lesiones características provocadas en animales de laboratorio (conejos y cobayos); d) alergia positiva y durable en los cobayos controles de inocuidad de la vacuna guardados durante un año en observación; e) formación de anticuerpos específicos en inoculaciones experimentales en conejos.

REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA**DE LA****Sociedad de Medicina Veterinaria del Uruguay**

Los trabajos serán presentados escritos a máquina. — Deberán constar de Conclusiones y Resumen. — Los originales no se devolverán. — Los apartados y clisés serán pagados por los interesados

La Revista se distribuirá gratuitamente entre los asociados.



Se ruega el Canje. — Please Exchange

Veuillez Echanger. — Deseja-se a permuta