

CENTRO DE INVESTIGACION DE LA BRUCELOISIS
DIRECTOR: Dr. PABLO PURRIEL

LA ACCION INHIBITORIA DE LA PIOCIANINA FRENTE A LAS BRUCELLAS ABORTUS, SUIS Y OTROS AGENTES

Por N. PRADINES BRAZIL
Jefe del Laboratorio Experimental

Entre los estudios realizados sobre la inhibición de Brucellas y otros microbios, hemos efectuado algunos ensayos con un producto metabólico de la *Pseudomonas pyocyanea*, el pigmento azul de la misma llamado piocianina, que creemos de interés señalar.

Algunos organismos del género *Pseudomonas* conocidos por su característica difusión de pigmentos poseen acción bacteriostática, bactericida y bacteriolítica, sobre varios microbios patógenos y saprofitos.

Los nombres de *Pseudomoas pyocyanea*, *fluorescens*, *putida*, etc., están asociados a numerosísimas investigaciones desde Pasteur en 1877 hasta las de Roke, Jones y Mc Kee recientemente.

Waksmann, estudiando la acción antibiótica, *in vitro*, de la *Pseudomonas pyocyanea*, incluyó entre los microbios inhibidos, a la *Brucella abortus*.

Nosotros, conociendo estos trabajos que tratan de la acción *in vitro* sobre la *Brucella abortus*, deseamos obtener conclusiones sobre las inhibiciones *in vitro* e *in vivo* tanto sobre la *Br. abortus* como sobre la *Br. suis* y *melitensis*, por la *Pseudomonas pycyanea*, así como deseamos conocer exactamente cuál es la sustancia responsable de esa inhibición.

Este trabajo se refiere principalmente a la inhibición de la *Br. suis* y *abortus*. Dejamos de lado el estudio bacteriológico del género *Pseudomonas* y el de sus productos metabólicos, porque es ampliamente tratado en la bibliografía que acompaña a este trabajo.

En primer lugar, tratamos de obtener un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de la *Pseudomonas* y que permitiera un máximo de producción y de difusión de sus productos metabólicos.

Ensayamos medios de gelosa simple, caldo simple, agar hígado, caldo hígado, papa, agar papa, papa glicerinada, triptosa agar (Difco), caldo triptosa fosfato (Difco) idem al 1/3, triptosafosfato agar, peptona agar, peptona digerida durante 2 y 4 horas de incubación, todos a pH 6, 8; Czapek - Dox y Sabouraud a pH 6.

La producción de piocianina varía mucho en los distintos medios de cultivos. Se destacó de una manera notable por su riqueza en piocianina la siembra realizadas en triptosa agar (Difco). Meses más tarde, con otras cepas de *Pseudomonas* y con otras partidas de dicho medio de cultivo no

obtuvimos los mismos resultados. Como medio de cultivo usamos la triptosa agar (Difco) y a falta de ella usamos la peptona Evans incubada 2 y 4 horas a 37° en presencia de tripsina al 1/100. Los resultados obtenidos con cada uno de los medios de cultivo señalados y las características de cada una de sus siembras lo hemos publicado en un trabajo anterior (1).

- Los ensayos de inhibición consistieron en distintas clases de pruebas:
- 1º Inhibición in vitro de *Br. abortus* y suis por la acción directa de la *Pseudomonas*.
 - 2º Inhibición in vitro de los mismos gérmenes por los productos metabólicos de *Pseudomonas* y particularmente por la piocianina.
 - 3º Acción de la piocianina sobre los elementos figurados de la sangre.
 - 4º Acción del suero sanguíneo sobre la piocianina.
 - 5º Acción antibiótica de la piocianina sobre *Brucellas* inoculadas en embrión de pollo.
 - 6º Acción antibiótica de la pioninina in vivo en distintos animales de experiencia, frente a *Br. abortus*.
 - 6º Acción de la piocianina sobre los animales inoculados.
 - 8º Acción antibiótica de la pioniacina frente a la *Pasteurella avicida* y a la *Salmonella pullorum*.

I

1º—La primera experiencia que despertó nuestro interés fuá la realizada mediante siembras sucesivas y simultáneas, sobre un mismo medio, de cepas de *Brucellas* y *Pseudomonas*. A las 24 horas de realizadas dichas siembras, sólo se podían reconocer por su morfología y aislamiento, la segunda especie de microbios sembrada. A las 48 y a las 72 horas el resultado era el mismo.

2º—En otros tubos de triptosa agar se sembraron — en estriás amplias y desde puntos opuestos — *Br. abortus* y suis *Pseudomonas*, teniendo siempre cuidado de hacerlo en ese orden. En estos tubos, a las 24 horas, se encontró bien desarrollada, en estria, la siembra de *Pseudomonas*; en cambio en la estria correspondiente a las *Brucellas* no se notaba desarrollo alguno, salvo cuando ello no correspondía a la zona de difusión pigmentaria.

3º—En cajas de Petri, con igual medio de cultivo, se sembraron suspensiones de *Br. abortus* cepa Nº 19 de B. of A. I. de los EE. UU. *Br. abortus* cepa L. P. del I. de H. Experimental de Montevideo y *Br. suis* cepas 9, 6620 y 4595 del L. de Biología Animal de la D. de Ganadería (2). Las placas de Petri sembradas fueron secadas a la estufa. Luego, fueron nuevamente sembradas pero en trazado ecuatorial — según el método de Garré — con un asa débilmente cargada de *Pseudomonas pyocyanea* del L. de B. A. de la D. de Ganadería. Al cabo de 24 horas se vió un exuberante cultivo de tinte azulado en su zona central y en el que se pudo diagnosticar por frote y aislamiento, *Pseudomonas pyocyanea*. A ambos lados del cultivo — zona de difusión de los productos metabólicos de la *Pseudomonas* — una pigmentación azul que se esfuma a medida que se aleja del cultivo, señala una inhibición evidente. En las zonas distales donde no se nota pigmento el cultivo de *Brucellas* se desarrolla bien. Los frotes y aislamiento

de las tres zonas muestran características bien distintas. En la zona central que corresponde a la siembra de *Pseudomonas*, se notan pequeños bacilos gram negativos, móviles, productores de piochanina. La siembra del raspado de la zona de inhibición generalmente es estéril. Cuando ella se hace de la parte más vecina al cultivo de *Pseudomonas* nos mostrará cultivos de ese tipo dada la motilidad del mismo que puede encontrarse en una zona vecina al cultivo de *Brucellas* y no se toca a éste, generalmente los pasajes son negativos. En la zona más alejada de la siembra equatorial se aíslan *Brucellas*.

4º—Varias experiencias se realizaron usando medios líquidos. Se sembraron en los mismos los dos agentes — *Brucellas* (*abortus* o *suis*) y *Pseudomonas* — y siempre fué fácil constatar la presencia de la última y la ausencia de la primera al final de la incubación.

ASÍ DEMOSTRAMOS QUE TANTO LA *Br. ABORTUS* COMO LA *Br. suis* ERAN INHIBIDAS EN SU DESARROLLO POR LA *PSEUDOMONAS* Y FUE SIEMPRE VISIBLE LA PRESENCIA DE UNA IMPORTANTE ZONA DE DIFUSIÓN DE PIOCHANINA.

II

5º — Tubos de cultivo donde las *Pseudomonas* habían producido una copiosa cantidad de pionianina, fueron lavados para eliminar de sus superficies los cultivos de *Pseudomonas* desarrollados. Esos medios de cultivos fueron fundidos al bañomaría y comprobado su pH. Una vez enfriados en pico de flauta, se sembró en ellos distintas cepas de *Brucellas* no obteniéndose resultado positivo en ninguno.

Hecha la misma experiencia en tubos donde se habían sembrado cepas de *Br. abortus*, pero sembrando al final de la misma la cepa de *Pseudomonas* de la experiencia anterior, el resultado fué completamente distinto. Las *Brucellas* no se desarrollan donde se cultivaron *Pseudomonas*; en cambio estas últimas prosperan donde habían crecido *Brucellas*.

6º—Otros tubos, donde se habían cultivado *Pseudomonas*, fueron lavados y calentados a 100º durante 10 minutos. En medio de cultivo fundido fué distribuido en otros tubos quedando en ellos en las proporciones de de 1/10 y de 1/100. Enfriados de la manera indicada, fueron sembrados con cepas de *Br. abortus* y *suis*; los resultados negativos. Debemos agregar que las *Brucellas* son mucho más exigentes para el crecimiento que las *Pseudomonas*.

ESTAS EXPERIENCIAS DEMUESTRAN QUE EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DONDE SE DESARROLLARON *PSEUDOMONAS* Y DIFUNDIERON PIOCHANINAS, ETC., NO CRECEN *BRUCELLAS*; PERO ELLAS NO NOS INDICAN DE UNA MANERA CONCLUYENTE, CUAL O CUALES SON LOS AGENTES DIRECTOS DE ESA INHIBICIÓN.

Para ello estudiamos la acción particular y conjunta de los productos metabólicos de la *Pseudomonas pyocyanea*.

Se sembraron varios frascos — nunca menos de 10 en cada extracción — de triptosa agar inclinados, con una suspensión de *Pseudomonas*. Al cabo de 48 a 72 horas de incubación se eliminaron los cultivos de sus super-

de las tres zonas muestran características bien distintas. En la zona central que corresponde a la siembra de *Pseudomonas*, se notan pequeños bacilos gram negativos, móviles, productores de pioctianina. La siembra del raspado de la zona de inhibición generalmente es estéril. Cuando ella se hace de la parte más vecina al cultivo de *Pseudomonas* nos mostrará cultivos de ese tipo dada la motilidad del mismo que puede encontrarse en una zona vecina al cultivo de *Brucellas* y no se toca a éste, generalmente los pasajes son negativos. En la zona más alejada de la siembra ecuatorial se aisan *Brucellas*.

4º—Varias experiencias se realizaron usando medios líquidos. Se sembraron en los mismos los dos agentes — *Brucellas* (*abortus* o *suis*) y *Pseudomonas* — y siempre fué fácil constatar la presencia de la última y la ausencia de la primera al final de la incubación.

ASÍ DEMOSTRAMOS QUE TANTO LA *Br. ABORTUS* COMO LA *Br. suis* ERAN INHIBIDAS EN SU DESARROLLO POR LA *PSEUDOMONAS* Y FUE SIEMPRE VISIBLE LA PRESENCIA DE UNA IMPORTANTE ZONA DE DIFUSIÓN DE PIOCTIANINA.

II

5º — Tubos de cultivo donde las *Pseudomonas* habían producido una copiosa cantidad de pioctianina, fueron lavados para eliminar de sus superficies los cultivos de *Pseudomonas* desarrollados. Esos medios de cultivos fueron fluidos al bañomaria y comprobado su pH. Una vez enfriados en pico de flauta, se sembró en ellos distintas cepas de *Brucellas* no obteniéndose resultado positivo en ninguno.

Hecha la misma experiencia en tubos donde se habían sembrado cepas de *Br. abortus*, pero sembrando al final de la misma la cepa de *Pseudomonas* de la experiencia anterior, el resultado fué completamente distinto. Las *Brucellas* no se desarrollan donde se cultivaron *Pseudomonas*; en cambio estas últimas prosperan donde habían crecido *Brucellas*.

6º—Otros tubos, donde se habían cultivado *Pseudomonas*, fueron lavados y calentados a 100º durante 10 minutos. En medio de cultivo fundido fué distribuido en otros tubos quedando en ellos en las proporciones de de 1/10 y de 1/100. Enfriados de la manera indicada, fueron sembrados con cepas de *Br. abortus* y *suis*; los resultados negativos. Debemos agrigar que las *Brucellas* son mucho más exigentes para el crecimiento que las *Pseudomonas*.

ESTAS EXPERIENCIAS DEMUESTRAN QUE EN LOS MEDIOS DE CULTIVO DONDE SE DESARROLLARON *PSEUDOMONAS* Y DIFUNDIERON PIOCTIANINAS, ETC., NO CRECEN *BRUCELLAS*; PERO ELLAS NO NOS INDICAN DE UNA MANERA CONCLUYENTE, CUAL O CUALES SON LOS AGENTES DIRECTOS DE ESA INHIBICIÓN.

Para ello estudiamos la acción particular y conjunta de los productos metabólicos de la *Pseudomonas* *pyocyanea*.

Se sembraron varios frascos — nunca menos de 10 en cada extracción — de triptosa agar inclinados, con una suspensión de *Pseudomonas*. Al cabo de 48 a 72 horas de incubación se eliminaron los cultivos de sus super-

ficies. Los medios de cultivo fueron desmenuzados en pequeños fragmentos los cuales fueron cubiertos con cloroformo durante 2 horas. Una vez que el cloroformo se hubo apoderado del pigmento de la *Pseudomonas*, se filtró por papel. El cloroformo toma un color azul de Prusia tanto más intenso cuanto mayor cantidad de piocianina tenga. Se agita el cloroformo con una solución de a. clorhídrico al 1/100 o al 1/200 durante unos minutos y la piocianina pasa a la solución ácida abandonando al cloroformo y otros productos de la *Pseudomonas*. Se alcaliniza con amoniaco y a un pH 6-7 vuelve al color azul. De ella puede extraerse nuevamente con cloroformo y continuar su purificación. Despues de llevarla por última vez al cloroformo se pasa a un decantador y se separa el cloroformo con piocianina el agua. El cloroformo con piocianina lo evaporamos al vacío desecando completamente el material que se presenta en muy finas y pequeñas agujitas azules, fácilmente solubles en el agua. Esta operación debe repetirse si los cristales de piocianina no son puros. Para obtener estos cristales basta disolver la piocianina en agua destilada y dejarla evaporar sobre un porta objeto. A muy pequeño diámetro si la evaporación es lenta se pueden ver los cristales. En algunos casos se ven hasta a simple vista.

La piocianina la recogemos con agua destilada y la encerramos en ampollas donde se conserva largo tiempo. El agua utilizada es estéril y a pH 7. Despues de extraer la piocianina queda en el matraz de la destilación la hemipiocianina (Waksmann).

Con la piocianina se hicieron las siguientes experiencias:

7º — Se agregó 1c.c. de piocianina al 1/250, 500 y 1000 en tubos que tenian 10c.c. de medio de cultivo en fusión. Una vez inclinados y solidificados fueron sembrados con *Br. abortus* y *suis*. A las 72 horas no habían proliferado; en cambio las siembras de las mismas cepas realizadas en iguales medios de cultivo, pero sin piocianina, dieron cultivos abundantes de *Brucellas* a las 24 horas.

8º — En 3c.c. de piocianina al 4/1000 se hizo una suspensión de *Brucellas abortus* y en otros 3c.c. de la misma suspensión, de *Br. suis*. Se hicieron siembras con la suspensión recién preparada; y a la hora, 24 horas y 5 días de preparada y mantenida en heladera. Los resultados fueron los siguientes: Con la suspensión de reciente preparación se obtuvieron en general superficies cubiertas por colonias confluentes si el lavado de dicha superficie era rápido y se dejaba el tubo en posición vertical. La siembra realizada con la suspensión de 1 horas daba colonias aisladas las que según sus tamaños podían contarse de 8 a más por centímetro cuadrado de superficie. La siembra realizada con suspensión de 24 horas, generalmente da cultivos negativos, aún cuando ha habido algunos de ellos con 2 o 3 colonias por unidad de superficie sembrada. Con las suspensiones de uno a cinco días no hemos obtenido cultivos positivos.

La coloración al Gram de las distintas suspensiones, mostraban coccobacilos correspondientes a dichos gérmenes y que no habían perdido sus características morfológicas. LA PIOCIANINA, ES PUES, BACTERIOSTÁTICA Y SEGURAMENTE BACTERICIDA PARA LA *BR. ABORTUS* Y LA *BR. SUIS*; PERO NO ES BACTERIOLÍTICA:

99. — Sembramos sobre triptosa agar (Difco) en cajas de Petri, suspensiones de *Br. abortus* y *Br. suis*. Luego colocamos tubitos como los ideados por Heatley para la titulación de la penicilina (Abraham); en ellos vertimos algunas gotas de pioceanina al 1/10.000 y las llevamos a la estufa. A las 24 horas se observaba una corona alrededor del tubito, en la cual no se habían desarrollado las Brucellas; fuera de dicha corona y en forma cada vez más densa, la superficie del medio de cultivo, estaba cubierta de colonias de Brucellas y tanto más cubiertas cuanto más densa fuera la suspensión sembrada.

10. — Hemos obtenido, también, cultivos negativos, sembrando Brucellas *abortus* y *suis* sobre triptosa agar cuya superficie había estado en contacto con una solución de pioceanina al 1/2000 durante un tiempo mayor de una hora. Se sembraron cepas de *Br. abortus* y *suis*; lo mismo se hizo con otros Gram negativos — en este caso la *Salmonella Pullorum* — en los tubos señalados. Como tubos testigos se tomaron algunos del mismo medio de cultivo, pero sin agregado de pioceanina. En los tubos testigos el desarrollo microbiano fué muy bueno. En los tubos con pioceanina no prosperaron la *Br. abortus* y *suis*; en cambio la *Salmonella pullorum*, si bien a las 24 horas presentaba un escaso desarrollo, a las 72 horas el crecimiento era buena. En este caso no hubo inhibición bacteriana franca, pero la sustancia retardó el crecimiento de la *Salmonella*.

Estudiamos también la acción antibiótica de la fluorescina de la hemipioceanina y de un extracto de *Pseudomonas* (3).

11. — La fluorescina es un pigmento amarillo al cual se le ha negado acción antibiótica (Waksmann). Se obtiene cuando la *Pseudomonas* se cultiva en medios fosfatados. Para obtenerla preparamos un medio sólido con el caldo triptosa fosfato (Difco). En este medio se sembraron suspensiones de *Pseudomonas*. Al cabo de 24 horas las *Pseudomonas* presentaban un buen desarrollo y el medio había tomado un ligero color amarillo y a veces amarillo con un ligero tinte verdoso. A las 48 horas se eliminó el cultivo con repetidos lavajes con agua destilada estéril y el medio de cultivo fué desmenuzado en pequeños fragmentos. Estos fueron cubiertos con agua destilada o solución fisiológica. De ambas maneras se obtuvo una solución amarilla oscura de un pigmento insoluble en cloroformo. Fué filtrada y así estuvo en condiciones de usarse. Los ensayos en cajas de Petri con tubos Heatley en inhibición de *Br. abortus* y *suis* fueron negativos.

12. — La hemipioceanina se obtuvo de la solución clorosómica después de extraer la pioceanina. Por desecación al vacío o por destilación a presión reducida se pudo obtener la eliminación total del cloroformo. Se trató el residuo seco con agua destilada estéril y se extrajo un pigmento débilmente amarillo que no puede confundirse con la fluorescina y que además es soluble en cloroformo. Se hicieron los mismos ensayos señalados en el número anterior, también con resultados negativos.

13. — El extracto usado es el glucido lípido obtenido por el método de Boivin y Mesrobian. Se sembró un medio de cultivo que daba poco rendimiento de pioceanina — sólido o líquido — con una suspensión de *Pseudo-*

monas. Al cabo de 24 horas se emulsionó el cultivo con agua destilada estéril para retirarlo del medio. Se centrifugó hasta clarificar el líquido. Nosotros centrifugamos 30 minutos a 3500 revoluciones porque era lo que nos permitía nuestra centrifuga; pero los autores lo hacen a 10.000 revoluciones. Eliminamos el líquido sobrenadante y repetimos la operación a fin de realizar un buen lavado del puré microbiano. Agregamos a dicho puré microbiano, ácido tricloroacético N/4 en la proporción de 1 c.c. de puré microbiano por 9 c.c. de á. tricloroacético. Despues de agitarlo bien lo llevamos 3 horas a la heladera — también lo hemos dejado 24 horas como lo señalan algunos autores — y nuevamente lo centrifugamos. Finalmente recogimos la parte líquida, la que dializamos 24 y 48 horas en sacos colodión y también de celofán. Suspendimos la dialisis cuando el agua del lavado no cambiaba su pH después de varias horas de contacto. El líquido obtenido es de apariencia lechosa. Es el antígeno completo de Boivin y Mesrobeanu. Se ha desprendido de algunas trazas de piocianina por medio de la dialisis.

Con este extracto se hicieron las mismas pruebas que con fluorescina y hemipiocianina, siendo también sus resultados negativos.

Y bien, se han realizado diversas pruebas de antibiosis con fluorescina, hemipiocianina y extracto glucido lípido de *Pseudomonas*. En ninguna de ellas hemos podido comprobar acción positiva de antibiosis. Tampoco hemos podido comprobar que la asociación de fluorescina y hemipiocianina aumenten o disminuyan la actividad antibiótica de la piocianina.

EN RESUMEN, ES LA PIOCIANINA — EL ELEMENTO ANTIBIOTICO DE LA PSEUDOMONAS PYOCYANEA — QUE INHIBE EL CRECIMIENTO DE LA BR. ABORTUS Y SUIS.

III

14. — Colocamos en un tubo de ensayo 0,5 c.c. de suspensión microbiana en solución fisiológica e iguales cantidades de suero normal y solución de piocianina al 4/1000. Dejados 24 horas a 4 grados de temperatura, fueron sembrados más tarde en triptosa agar y agar hígado. A las 72 horas los cultivos eran todavía negativos. El suero sanguíneo no alteró la acción bactericida de la piocianina. La misma experiencia se realizó a 37° con igual resultado.

IV

15. Otra experiencia consistió en estudiar la acción de la piocianina en solución fisiológica al 4/1000 aproximadamente en sistemas opsónicos preparados con sueros negativos y positivos; lo que fué realizado de la siguiente manera: En pequeños tubos colocamos 0,1 c.c. de suspensión microbiana de Br. abortus, 0,1 c.c. de sangre normal citratada y 0,1 c.c. de la solución de piocianina indicada. Despues de 30 minutos de estufa a 37° se hicieron frotos que se tiñeron con azul de toluidina anilinado y tianina anilinado. La lectura microscópica de las láminas indicaban que no había fogocitosis; es decir que el fenómeno se había realizado como si no hubiera estado presente la piocianina. Realizamos la misma experiencia con la sangre de brucellosos y en ningún caso fué alterado el resultado de la reacción. Lo que quiere decir que la piocianina no altera la función fogocitaria de los leucocitos. Por otra

parte la observación de las láminas con frotos de sangre no muestran ninguna alteración en la morfología de los elementos figurados de la misma. LAS EXPERIENCIAS DE LAS SECCIONES III Y IV MUESTRAN QUE LA PIOCIANINA NO ATACA A LOS ELEMENTOS FIGURADOS DE LA SANGRE Y QUE EL SUERO SANGUINEO NO IMPIDE LA ACCION DE LA MISMA.

V

16. — Se sembraron 12 embriones de pollos de 9 días de incubación con suspensiones de *Br. abortus*. A 6 de ellos se les inyectó piocianina, 1c.c. al 1/1000. Al cabo de 3 días de incubación se hizo aislamiento de las Brucellas sembradas. Se aislaron de 4 de los testigos y de 2 de los inoculados con piocianina. ESTA PRUEBA NO ES CONCLUYENTE PERO DENOTA CIERTA EFICACIA DE LA SUSTANCIA ANTIBIOTICA IN VIVO.

IV

17. — Fueron inyectados ratones, cobayos y conejos con piocianina, previa inoculación de Brucellas. Hasta ahora no podemos dar resultados definitivos. Las experiencias siguen su curso y ellas serán motivo de una comunicación posterior. Es muy difícil obtener resultados positivos en el estudio de la Brucelosis desde el punto de vista de la terapéutica experimental. Esta es una enfermedad de curso crónico y progresivo; frecuentemente no se observan lesiones macroscópicas en los animales infectados experimentalmente. Los cultivos de órganos, sangre etc., son negativos en las infecciones a *Br. abortus* muy a menudo. Sus exigencias culturales y la rapidez en desaparecer de la sangre, son factores que hacen más difícil el contralor de la experiencia. Pero cuando estos cultivos son positivos confirman inequívocamente a la enfermedad. La presencia de aglutinas, alerginas, opsoninas, tiene un valor muy limitado aunque desigual, en el estudio de la terapéutica experimental de la brucelosis. Ellos pueden aparecer después de la inoculación de Brucellas muertas; después de la inoculación de Brucellas suspendidas en pionianina o persistir después de la inoculación de pionianina en sujetos brucelosos en los cuales hipotéticamente hubieran muerto las Brucellas por la acción de la piocianina. En resumen en los animales testigos y en los de experimentación se encontrarán anticuerpos; mayor cantidad en los primeros que en los últimos. Luego la presencia de anticuerpo en el estudio de la antibiosis por piocianina u otra sustancia, en la brucelosis a *Br. abortus* es de valor relativo. Sólo la presencia o ausencia del microbio en testigos o inyectados puede hacer una comprobación segura de la sustancia a estudio. Y aún así habría alguna reserva.

VII

18. — Fueron inoculados ratones, cobayos y conejos con piocianina. Se usaron las vías subcutáneas, intramuscular, intravenosa, intracardiaca e intraperitoneal para las inoculaciones de piocianina (4). En ninguno de los numerosos ensayos hubo accidentes, ni aún cuando se hicieron inoculaciones intracardiacas de la 1c.c. de piocianina concentrada. A la autopsia tampoco se revelaron lesiones. La observación de los inyectados y el control de su temperatura frente a animales testigos, tampoco señalaron acción

tóxica de la piocianina. Un hecho que hemos podido constatar es que la piocianina se elimina muy rápidamente por la orina. Se inyectaron cobayos por vía intracardíaca y a la hora se encontraba la piocianina en la vejiga. Inyectada la piocianina a una rana vivisecada, se vió aparecer la piocianina en su vejiga a los 30 minutos. Esto demuestra la rapidez y facilidad de eliminación de la sustancia antibiótica estudiada, factor que si por una parte, tiene una significación de valor positivo, por otra, exigirá métodos especiales de aplicación y de observación de los efectos antibióticos.

— VIII —

Hemos usado algunas cepas de otros microbios en los ensayos de antibiosis. Unos fueron hechos con *Salmonella Pullorum* con resultados débilmente positivos. Resultados más alentadores los obtuvimos con *Pasteurella avicida*.

19. — En cajas de Petri y con tubos de Heatley hemos obtenido resultados positivos de inhibición de *P. avicida* con soluciones de piocianina al 1/50.000 y una corona de inhibición de 1cm con piocianina al 1/80.000. Con Brucellas llegamos a diluciones de 1/150.000.

20. — Se inyectaron cobayos por vía intraperitoneal con suspensiones de *P. avicida* y se hicieron las inyecciones de piocianina por vía intramuscular e intraperitoneal. Murieron inoculados y testigos. En los cobayos que se inyectó piocianina se notó agravación de los mismos después de la suspensión de la piocianina y siempre hubo retardo en sus muertes. Haremos nuevos ensayos inyectando dosis infectantes no masivos e inoculando periódicamente la piocianina.

C O N C L U S I O N E S

- 1º—La *Pseudomonas pyocyanea* inhibe tanto a la *Br. abortus* como a la *Br. suis*.
- 2º—Su pigmento llamado piocianina realiza la misma acción antibiótica.
- 3º—La piocianina es bacteriostática, probablemente bactericida, pero no bacteriolítica.
- 4º—La piocianina no altera in vitro a los elementos figurados de la sangre ni modifica el poder fagocitario de los leucocitos.
- 5º—El suero sanguíneo no impide — in vitro — la acción de la piocianina.
- 6º—No hemos encontrado propiedades antibióticas para Brucellas abortus y suis en fluorescina, hempiocianina y en el compuesto glucido lípido de las *Pseudomonas*.
- 7º—La piocianina parece guardar sus propiedades antibióticas en embrión de pollo.
- 8º—No hemos logrado hasta ahora la acción in vivo de la piocianina. Hay experiencias en marcha.
- 9º—La piocianina no causa trastornos ni lesiones aparentes en los animales inoculados.
- 10.—La piocianina inhibe in vitro a la *Pasteurella avicida*.

RESUMEN

Las pseudomonas *pyocyanea* produce piocianina, que se difunde en los medios de cultivo. Es un pigmento azul soluble en agua.

De las experiencias realizadas se deduce que la piocianina inhibe totalmente el crecimiento de las *Br. abortus* y *suis* *in vitro*.

Los ensayos se realizaron disolviendo piocianina en los medios de cultivo y empleando la prueba de Abrahán.

La piocianina ha demostrado ser activa junto al suero sanguíneo.

No altera los elementos figurados de la sangre, ni tampoco el poder fagocitario de los leucocitos.

La fluorescina y la hemipiocianina, productos metabólicos de la pseudomonas no tienen acción contra las Brucellas.

El antígeno glucido lípido de las pseudomonas tampoco tiene acción sobre las Brucellas.

En los ensayos hechos hasta ahora en embrión de pollo parece mantenerse la propiedad inhibitoria, de la piocianina.

El estudio de la acción *in vivo* de la piocianina aún no se ha terminado.

No se han observado trastornos ni se han encontrado lesiones aparentes en los animales inyectados por vías subcutánea, intramuscular, intravenosa, intracardiaca e intraperitoneal.

La piocianina ha demostrado poseer un alto poder antibiótico frente a la *pasteurella* avicida.

-
- (1) N. Pradines Brazil. — Inhibición de Brucellas *suis* y *abortus* por productos metabólicos de Pseudomonas — Arch. U. de Med. Cir. y especialidades 1946.
 - (2) Posteriormente se comprobaron los mismos resultados con otras cepas.
 - (3) Omitimos el de la piocianasa porque sus resultados son conocidos.
 - (4) Debo agradecer la colaboración prestada por el Dr. Enrique Blum, en esta parte de los trabajos.