

OBTENCION DE UNA CEPA AVIRULENTA, ALISOGENICA Y ASPOROGENA DE *BACILLUS ANTHRACIS*

DR. TEODORO VERA, D.V.M., Ph. D. *

R E S U M E N

El objeto de esta investigación fue desarrollar una esporovacuna de anthrax atenuado por el calor capaz de producir inmunidad, particularmente en bovinos. Una cepa esporógena y virulenta de *Bacillus anthracis*, lisogénica (con infección latente de un bacteriófago-virus bacteriano), denominada S14 fue incubada a altas temperaturas (41-42°C) durante 2 meses y haciendo resiembras en caldo triptosa fosfatado cada 48 horas. Al final de los 2 meses de incubación se hicieron pruebas de identificación para el *Bacillus anthracis* en caldo de cultivo, designándosela como cepa V14. Se hicieron controles para determinar que estuviera libre de contaminación por *Bacillus cereus* y *Bacillus subtilis*. Todas las pruebas de identificación fueron positivas para *Bacillus anthracis*. El microorganismo era inmóvil, no hemolítico, altamente susceptible al bacteriófago específico y susceptible a la prueba del agar con penicilina.

Coloraciones de Gram a un cultivo de 2 días de la cepa V14 revelaron que cada bacilo tenía 1 o más cuerpos esféricos pequeños, pero carecía de un verdadero y típico esporo del *Bacillus anthracis*. Cuando una suspensión de un cultivo de 3 días de la cepa V14 fue sometida a un

shock calórico de 60°C por 30 minutos, no se encontraron microorganismos viables, indicándose con ello la no existencia de esporos resistentes.

Cultivos de cepa V14 en agar triptosa a temperatura-ambiente fueron negativos si no se hacían resiembras en períodos de 2 semanas a 1 mes; los bacilos de estos cultivos llegaron a la autólisis, la cual se puso en evidencia por la presencia de material granuloso y la carencia de esporas o esporangios en las coloraciones teñidas por Gram. Para poder mantener los cultivos en stock fue necesario liofilizar la cepa V14.

Pequeñas cantidades de esporos (10^2) de la cepa S14 fueron suficientes para producir la muerte en todos los ratones inoculados intraperitonealmente y los frotis de los tejidos coloreados con Giemsa mostraron bacilos encapsulados. El crecimiento de la cepa S14 en Agar-bicarbonato de sodio, fue de colonias lisas o mucoides que indicaban que el microorganismo era virulento y también hubo formación de cápsulas.

* Profesor visitante en la Facultad, de la Misión de Nebraska en Colombia.

El crecimiento de colonias rugosas en este medio es producido solo por cepas avirulentas. En contraste con esto, la cepa variante V14 no produjo muerte de ratones cuando se inocularon con 0.2 ml. de un cultivo de 24 horas en caldo y el crecimiento que se desarrolló en agar con bicarbonato de sodio fue de tipo rugoso.

Otra diferencia observada entre la cepa S14 y la variante V14 fue en la producción de bacteriófago. La cepa S14 fue lisogénica, pero no se pudo demostrar la producción de bacteriófago por la cepa V14. Un hecho muy importante es la alta susceptibilidad al bacteriófago por la cepa V14, aislado de la cepa paterna. Estudios adicionales demostraron que la

cepa variante fue susceptible al bacteriófago de muchas cepas lisogénicas de *Bacillus anthracis*, habiendo sido utilizada como un indicador para determinar la lisogenicidad. Además se prepararon filtrados de bacteriófago específico, con un alto título para el *Bacillus anthracis* con esta cepa, con la seguridad de que no se presentaría infección o contaminación con el *Bacillus anthracis*.

Veinte ratones que fueron inoculados para determinar la virulencia de la cepa V14, recibieron una dosis descargada de 10^3 esporas de la cepa S14. Todos los ratones inoculados murieron en 24 horas. No se han hecho pruebas inmunológicas adicionales.