
*TRABAJO DE LA "SOCIEDAD DE ESTUDIOS DE PATOLOGIA
QUIRURGICA"*

EL BACTERIOFAGO DE D'HERELLE

(Trabajo presentado a la Sociedad de Estudios de Patología Quirúrgica,
el 12 de agosto de 1932, por el alumno Jorge L. Ramírez Sendoya).

Al lado de las enfermedades causadas por agentes perfectamente conocidos, visibles al microscopio gracias a procedimientos especiales de coloración, hay otras cuyo agente no se conoce a causa de la relativa insuficiencia de nuestros medios actuales de observación; estas misteriosas causas han sido denominadas Ultravirus o Virus filtrantes, relacionado este último nombre con la propiedad que tienen de atravesar los más finos filtros de porcelana. A esta categoría de enfermedades de Ultravirus, pertenecen: la Rabia, maravillosamente estudiada por Pasteur hasta llegar a dominarla con el descubrimiento del suero antirrábico; la Poliomielitis, suficiente estudiada por Landsteiner, Popper y Levaditi, quienes fijaron los caracteres del virus; el Zona, la Varicela, el Herpes y la Encefalitis epidémica que presentan semejanzas muy grandes; el Tracoma cuyo virus ha sido considerado como una forma de involución del gonococo; el Alastrim, la Viruela, la Vacuna, el Molusco contagioso y las Verrugas.

Hay otras enfermedades que se han clasificado entre las producidas por virus filtrantes sin que se hayan aducido pruebas concluyentes, como la Corea, las Paperas, el Sarampión, la Rubiola y el Dengue.

Pero no sólo el hombre padece enfermedades causadas por ultravirus; los animales y las plantas también pagan su tributo y así vemos entre ellas la Morriña, enfermedad propia de los ovídeos, la Fiebre Aftosa que ataca a los bóvidos y que puede ser transmitida al hombre.

Entre las enfermedades propias de las plantas ocupa lugar preferente desde el punto de vista industrial el mosaico del tabaco, cuyo virus fué descubierto en 1892 por Iwanowsky.

Pero el virus filtrante que más ha preocupado a los bacteriólogos modernos es el Bacteriófago, es decir, el parásito de los microbios, el que verifica la lisis de ellos y por consiguiente tiende a eliminar la causa de la enfermedad. Fué F. de D'Hérelle, Director actual del ser-

vicio bacteriológico del Consejo Sanitario Marítimo y Cuarentenario de Egipto, quien llevó al tapete de las discusiones científicas el problema asaz complicado y oscuro de esa maravillosa y benéfica enfermedad de los microbios causada por un ser vivo, invisible como los ultravirus, pero perfectamente cultivable y manejable, que denominó *Bacteriófago*.

Trataré en esta relación desmañada y sin mérito alguno, de resumir, lo más claramente posible, el problema de este nuevo agente terapéutico que tanto ha inquietado al mundo científico de los últimos años.

Hasta el descubrimiento de que nos ocupamos, la inmunidad adquirida era el resultado de la reacción lenta del organismo contra el agente mórbido; para obtenerla artificialmente era necesario, según la teoría pasteuriana, atenuar el virus, quitarle su agresividad, es decir, transformarlo en vacuna.

Para D'Hérelle, el agente de la inmunidad es un nuevo sér, el Bacteriófago, que va a perturbar la vida del microbio, a penetrar en él y a destruirlo; y así podemos decir que la inmunidad es una segunda enfermedad infecciosa que va a luchar contra la primera y a vencerla. Así veremos que si la epidemia cuyo agente es el Bacteriófago, logra imponerse, acabará con la otra epidemia en tiempo más o menos largo, según la virulencia de los enemigos contra quienes tiene que luchar, según las condiciones de resistencia mayores o menores que presenten los pacientes, según las condiciones higiénicas y el régimen y según también las condiciones de los agentes físicos que rodean el cuadro patológico.

DESCUBRIMIENTO

El 4 de diciembre de 1915, Twort publicaba en *The Lancet* algunas observaciones muy interesantes que tienen alguna relación con el problema que voy a tratar. Twort decía, que al sembrar sobre gelosa, vacuna generiana, aparecían algunas colonias de estafilococos, cosa perfectamente normal; pero a los pocos días algunas de ellas se transformaban, tomando un aspecto *vidrioso* y *transparente*, al mismo tiempo que los microbios adquirían el aspecto de finas granulaciones que se coloreaban en rojo con el Giemsa. A la vez, si un cultivo normal de estafilococos era tocado con una partícula de esas colonias anormales por medio de una asa de platino, las colonias normales tomaban al poco tiempo un aspecto *vidrioso* y *transparente*, y esta acción se extendía progresivamente sobre todo el cultivo.

Estas colonias anormales, disueltas en agua y filtradas sobre bujía de porcelana, daban un líquido que poseía la propiedad igual de transformar las colonias normales, y más aún, extendido sobre un tubo de

gelosa inclinado, impedía el desarrollo de todo cultivo estafilocócico que ahí se sembrara.

Twort vio además que esta propiedad se transmitía en serie, que duraba muchos meses y que se destruía a 60°. Además experimentó el mismo resultado con un microbio del grupo coli, así como también con un microbio aislado de un caso de diarrea infantil.

Twort dejó sin resolver este raro fenómeno y sentó las siguientes hipótesis: ¿Es un producto secretado por el microbio? ¿Es un elemento independiente, un sér vivo infravisible, semejante a los ultravirus, o es una enzima?

Claramente vemos, por lo anteriormente expuesto que Twort, antes que D'Hérelle, contempló este interesantísimo fenómeno de lisis microbiana, pero es indudablemente a este último a quien corresponde propiamente la gloria del descubrimiento, pues el bacteriólogo inglés se contentó con decir que era un fenómeno interesante, pero no sacó conclusiones de él, no se ocupó de desentrañar el fenómeno.

El 10 de septiembre de 1917 publicó D'Hérelle en *Comptes Rendus* de la Academia de Ciencias, su primera observación sobre el singular fenómeno que él creyó producido por un ultramicrobio y que denominó Bacteriophago, a causa de las propiedades precisas que presentaba al ponerlo en contacto con bacterias determinadas. Este ultramicrobio, que destruía *in vitro* los bacilos *disentéricos*, *tíficos* y *paratíficos*, lo había encontrado en las deyecciones de los convalecientes de Disenteria y de Fiebre Tifoidea.

Casi todos los Bacteriólogos del mundo acogieron con asombro este portentoso y singular fenómeno y quisieron reproducirlo experimentalmente en sus laboratorios, llegando unos a conclusiones semejantes a las de D'Hérelle, otros a muy distintas, posiblemente a causa de los procedimientos desemejantes que emplearon, y no pocos no tuvieron inconveniente en opinar de modo muy distinto negándole la vitalidad al principio tífico y considerándolo sin importancia alguna en la terapéutica moderna.

La primera experiencia, base de estos estudios, es la siguiente: En el Hospital Pasteur había un enfermo de disentería bacilar en tratamiento y cada día D'Hérelle tomaba algunas gotas de deyecciones, las ponía a incubar durante 12 horas en un tubo de caldo ordinario de cultivo y filtraba en seguida el producto sobre una bujía Chamberland; unas pocas gotas de este filtrado eran puestas en un tubo en donde se sembraba a la vez Bacilo de Shiga.

Mientras duró la enfermedad, nada raro se observó en los tubos y así los bacilos sembrados se desarrollaban normalmente produciendo el enturbiamiento del medio. Pero un día observó D'Hérelle que el tubo no se enturbiaba y cosa sensacional, ese día empezaba la convalecencia del enfermo. Algunas gotas de filtrado del tubo claro, agregadas

a un cultivo normal de Bacilo de Shiga, lo aclaraban y esta acción podía transmitirse indefinidamente en serie, aun con diluciones infinitesimales.

D'Hérelle quiso buscar la explicación de tan extraño fenómeno, y sentó la teoría, atrevida como pocas, de que esta lisis era producida por un *microbio invisible y filtrante*, que se desarrollaba a expensas de bacterias jóvenes y vivas. A este principio vivo le dió el nombre de "*Bacteriophagum intestinale D'Hérelle 1917*".

El fenómeno descrito presenta diversas modalidades, dependientes del medio de cultivo en que se verifique, de la temperatura a que se someta, de la concentración bacilar del cultivo y de su virulencia, de la mayor o menor resistencia de los microbios, de la más o menos grande virulencia del principio lítico que se va a poner en presencia de las bacterias, así como de la concentración en iones H del medio. Es preciso conocer todas estas modalidades, pues de ellas dependen los distintos resultados acusados por los múltiples investigadores que se han ocupado de este problema.

TEMPERATURA

Si a un cultivo de bacilos disintéricos agregamos unas gotas de Bacteriófago fuertemente virulento y lo sometemos a una temperatura de 37° en la estufa del laboratorio, podremos obtener el esclarecimiento del cultivo en un minimum de 3 horas. Si lo dejamos a la temperatura de 20°, el fenómeno se verificará a las 16 horas. A 0° el fenómeno no se produce. Si en experiencias sucesivas, vamos elevando paulatinamente la temperatura, veremos que el fenómeno se producirá hasta los 44°, cosa perfectamente explicable, pues el Bacteriófago únicamente obra sobre bacilos vivos y éste es el límite promediado de vitalidad de las bacterias.

La temperatura tiene una acción manifiesta sobre el Bacteriófago, señalándose para él límites de vitalidad semejantes a los de las Bacterias según algunos experimentadores, mientras que para otros, dados los distintos procedimientos a que someten el principio lítico y dada su calidad escogida, presenta resistencias mayores, semejándose por esta razón más bien a las *diastasas*, según la autorizada aseveración del Profesor Legroux, cosa que estudiaremos a su debido tiempo, cuando discutamos la naturaleza del Principio de D'Hérelle.

D'Hérelle y Sertic eligieron para las pruebas térmicas una cepa poco resistente, la *cepa Schwarzman antiestreptococcica*, la que si se cultiva en caldo glucosado con un PH de 7 a 8, es inactivada al someterla durante una hora en un baño maría que tenga una temperatura de 56° a 58°; pero esta misma cepa, si la sometemos a un calentamiento paulatino, puede conservar su vitalidad hasta una temperatura de 62°, o sea 4° más de la temperatura considerada como máxima. Los

mismos investigadores llegaron, mediante una serie de pasos sucesivos y de elevaciones pacientes y graduales de temperatura, acostumbrar ese Bacteriófago a la altura térmica de 68°, conservando una actividad lítica de igual intensidad.

Tschang-Kono-Ngen y Wagemans han observado que esta temperatura puede llegar hasta 83° y 85°, y Seiffert admite que un Bacteriófago puede ser sometido a una temperatura de 100° sin perder sus propiedades líticas.

Handuroy sostiene que el Bacteriófago resiste temperaturas distintas según su estado físico y así ha podido someter al Bacteriófago en cultivo líquido hasta una temperatura de 102°, y al Bacteriófago en polvo a 130°, pero únicamente por el término de 5 minutos, cosa perfectamente inaceptable en una experiencia de esta naturaleza.

Es preciso tener en cuenta que las experiencias arrojan distintos resultados, según el diámetro de los tubos de cultivos, según la concentración del cultivo y según la cepa que se escoja para la experiencia; además la temperatura debe controlarse con termómetros inmersos en el cultivo y no en el baño maría, pues las temperaturas alcanzadas en ambos medios son indudablemente distintas.

Franco Piccaluga y Manuela Yepes escogieron una *cepa anticoli* conservada en el museo del Instituto Massone de Buenos Aires, señalada con el nombre de *Cepa D.* y cuya temperatura crítica fué determinada en el año de 1929 en 62° y 63°, durante 30 minutos. Este Bacteriófago fué sometido a temperaturas paulatinamente crecientes en tubos de 16½ milímetros de diámetro y ½ milímetro de espesor, probando su actividad lítica después de cada temperatura a que era sometido; cuando se debilitaba su virulencia, se aumentaba ésta por medio de pasos sucesivos, continuando después el sometimiento a temperaturas cada vez más altas, hasta alcanzar un máximo de 99° a 100°, por espacio de 30 minutos, conservando después de esta prueba su perfecto poder lítico.

Hecho notable y que es preciso retener, para mejor comprensión de la naturaleza del Bacteriófago, es que, calentándolo hasta su atenuación y probado ese mismo día su poder lítico, su actividad se ve aumentada a los 2 ó 3 días después, viéndose por esto que el Bacteriófago se ha regenerado, ha recuperado su virulencia, procediendo como un principio vivo.

Ph.

El fenómeno de bacteriofagia se desarrolla electivamente en medio alcalino, aunque algunos bacteriófagos han podido verificar el fenómeno en medio ácido, y así Da Costa Cruz ha manejado un bacteriófago en un medio de un Ph 5,1 y Ashehor posee un Bacteriófago que lisa en un medio que va acidulándose paulatinamente, o sea que

el Bacteriófago se acostumbra a esa acción nociva claramente demostrada.

ANTISEPTICOS

No todos los antisépticos tienen acción nociva sobre el Bacteriófago y así se ve el caso de que éste se acostumbre a la acción, considerada como absolutamente incompatible con la vida, del *Fluoruro de Sodio* a la concentración del 1% al 2%. La *Quinina* lo inactiva en 30 minutos a la solución del 3% y por eso no debe administrarse cuando quiere administrarse el Bacteriófago. Algunas legislaciones orientales prohíben el empleo de la quinina en la tifo-malaria entre tanto haya sido hecho el diagnóstico de una manera precisa. El *Radium* apenas atenúa un poco su acción. Los *Rayos ultravioleta* matan el principio lítico y lo mismo podemos decir del *Bicloruro de Hg*, del Sulfato de cobre y el formol, notándose, respecto a este último, que sus vapores lo destruyen más ligero. El *Yatrén*, el *Rivanol*, la *Tripaflavina* y el *Verde Malaquita* no lo destruyen, pero impiden que su acción se manifieste. Estas nociones es preciso tenerlas en cuenta, pues es mejor no administrar ningún antiséptico cuando se haya escogido el Bacteriófago para tratar alguna enfermedad de las que se benefician notablemente con esta nueva adquisición terapéutica.

ASLAMIENTO DEL BACTERIOFAGO

La técnica de aislamiento se basa en el principio de que los Ultravirus atraviesan los filtros de porcelana. Los elementos indispensables son: Una bomba de hacer el vacío, provista de un manómetro, una bujía Chamberland y medios comunes de cultivo.

Cualquiera que sea el producto del cual se vaya a sacar el Bacteriófago, se sembrará primeramente en caldo ordinario o en agua peptonada y se pondrá a la estufa por 12 o 24 horas; el cultivo obtenido se filtra sobre tierra de infusorios o sobre papel, si el cultivo es muy espeso; el líquido resultante se pasa a través de una bujía de porcelana.

A la vez se prepara en caldo un cultivo del microbio que se quiere lisar, teniendo en cuenta que éste deberá tener una antigüedad de 24 horas como máximo en el momento de la experiencia. Con este cultivo microbiano se siembran cuatro tubos de agua peptonada o de caldo; el primer tubo se deja como testigo, y los otros tres recibirán respectivamente 1 gota, 1 c. c. y 2 c. c. del filtrado; se dejan a la temperatura de 20°, o sea a la temperatura general del Laboratorio. La lectura de los resultados se hará a las 12, 24 o 36 horas, y tres casos podrán resultar:

1º Los tres tubos a los cuales se ha agregado el filtrado están *perfectamente* claros, lo que indica que en la primera manipulación se aisló un principio lítico muy activo.

2º Los tres tubos están turbios, pero menos que el tubo testigo, lo que prueba que se ha aislado un Bacteriófago de actividad media.

3º Los tres tubos están tan turbios como el tubo testigo, lo que prueba, que no hay bacteriófago o que se ha aislado uno que tiene una actividad demasiado débil, caso en el cual es preciso exaltar su virulencia por pasos sucesivos en cultivos bacterianos jóvenes y a temperaturas apropiadas.

Interesante por demás es observar que algunas clarificaciones al parecer absolutas no lo son y así veremos mucha veces que al dejar esos tubos en la estufa durante un tiempo más o menos largo, adquieren nuevamente el enturbiamiento característico del primitivo cultivo microbiano. Esto se debe a que a veces el bacteriófago no tiene suficiente virulencia y quedan algunos bacilos vivos, que han resistido a su acción destructora, resemebrando nuevamente el medio de cultivo. Así pues, para la preparación comercial del Bacteriófago, es preciso partir siempre de Bacteriófagos reconocidamente virulentos, para evitar la vacunación espontánea de algunos elementos bacterianos. Además, si se quiere evitar la aparición de cultivos secundarios, en una preparación de Bacteriófago, es preciso filtrar cuidadosamente en bujía de porcelana la emulsión lisada.

TAMAÑO DEL BACTERIOFAGO

El estudio de la ultrafiltración permite apreciar aproximativamente las dimensiones de los ultramicrobios. Haciendo pasar por los ultrafiltros conocidos, soluciones coloidales cuyas dimensiones se conocen por la física, se ha llegado a titular los filtros y a medir los ultravirus. La unidad de medida para estas manifestaciones es el milimicron, o sea la millonésima del milímetro. Para hacer una comparación de la pequeñez de algunos virus filtrantes, entre los cuales se cataloga el Bacteriófago, recordemos el tamaño de algunos microbios: El bacilo tetánico mide de 2,000 a 4,000 milimicrones; el bacilo tuberculoso de 1,000 a 3,000 milimicrones; el estafilococo 1,000 milimicrones. Las medidas, aproximativas naturalmente, de algunos virus filtrantes, son: Los virus del Herpes, de la Encefalitis, de la Rabia, de la Vacuna, miden 30 milimicrones, es decir, los mismas dimensiones de los corpúsculos de *Colargol Coloidal*. Según las investigaciones de D'Hérelle, el Bacteriófago mide de 20 a 30 milimicrones. El virus de la Peste aviaria es más pequeño todavía, pues sólo mide 5 milimicrones.

Se comprende fácilmente, que aun con objetivos muy poderosos, y aun con el ultramicroscopio, es imposible ver estos microorganismos. La mínima longitud de onda perceptible es de 300 milimicrones, y por consiguiente todos los objetos cuyo diámetro sea menor a esta cifra, permanecen hasta ahora, perfectamente invisibles.

Borrel, por una técnica delicada de supercoloración, que consiste

en rodear los corpúsculos de los virus de una especie de vaina de colorante, ha llegado a ver, bajo forma de puntos, el parásito del molusco contagioso, el virus de la vacuna y aún el Bacteriófago. Pero estos punticos, apenas en el límite de la visibilidad, no permiten hacer el diagnóstico diferencial.

UNICIDAD DEL BACTERIOFAGO

Muy discutido ha sido este punto respecto al Bacteriófago. Algunos sostienen que hay un Bacteriófago para cada microbio; sin embargo es más aceptable la teoría de la *unicidad*, pues las experiencias de Mc-Kinley prueban que un Bacteriófago, por ejemplo, que ataca al bacilo de Shiga, puede, por adaptación, atacar al estafilococo, etc.

Hoy día se admite que hay una sola raza de Bacteriófagos, aunque hay diferentes *cepas*, que poseen caracteres individuales especiales, manifestados en su virulencia, su polivalencia o en sus propiedades físicas.

En algunos casos se puede aislar un Bacteriófago que obra con gran potencia sobre el bacilo de Shiga, con menor potencia sobre el Estafilococo y que presenta a la vez una acción lítica marcada, pero débil, contra el Bacilo de Eberth. Si este mismo Bacteriófago lo sometemos a 1.000 o más pasos sucesivos, sobre el Bacilo de Shiga, al fin de las experiencias encontraremos siempre su acción intacta, contra los otros microbios enumerados y gozando del mismo poder lítico.

Las experiencias han demostrado también palmariamente que la actividad lítica puede ser disociada por el calentamiento. Si tomamos un Bacteriófago activo contra el bacilo de Shiga y contra el bacilo Coli conjuntamente, y lo sometemos a un calentamiento por 5 minutos a 65° C., al fin de la experiencia veremos que sólo ataca al bacilo de Shiga, mientras que ha perdido toda acción contra el bacilo Coli. A la vez, por adaptaciones sucesivas, este Bacteriófago puede readquirir su poder lítico contra el bacilo Coli nuevamente.

NATURALEZA DEL BACTERIOFAGO

La mayoría de los estudios sobre el Bacteriófago se han limitado últimamente a discutir la naturaleza de éste, ya que sus propiedades terapéuticas, aunque limitadas, no pueden ponerse en duda.

Tres son las teorías principales que se han sentado respecto a este problema y que merecen una consideración serena, no sólo por la razón que las asiste, sino también por la prestancia científica de quienes las sostienen. La primera teoría sostiene que el Bacteriófago es un *principio químico extraño a la bacteria que sufre la lisis*. Fué sostenida por primera vez por Kabeshima, quien asegura que en el intestino de los animales existe un catalizador proveniente probablemente de los leucocitos, el que tiene por objeto activar una prodiastasa contenida en las bacterias, trayendo como consecuencia la lisis de ellas.

Ana Kuttner ha preparado maceraciones de hígado y de intestino delgado de curí, en glicerina, como vehículo; después de once días de maceración ha filtrado el producto en Bujía de Berkefeld, encontrando el Bacteriófago en ese filtrado. De esto concluye la investigadora anotada, que el Bacteriófago es fabricado por las células del hígado y del intestino y que se trata simplemente de una *enzima*.

El Profesor *René Legroux*, en comunicación del 26 de febrero del presente año a la Sociedad de Biología de París, sostiene que el Bacteriófago es una *diastasa* y aduce para ello argumentos de gran valor científico, basados especialmente en el hecho de que el Bacteriófago se comporta en presencia de algunos aceites esenciales del mismo modo que lo hacen las Diastasas. Empieza por demostrar el comportamiento de las bacterias en presencia de las esencias de mostaza, de romero y de canela, y acaba por hacer un parangón entre las diastasas y el Bacteriófago, de acuerdo con su resistencia ante tales aceites esenciales.

ACCION DE LAS ESENCIAS SOBRE LAS BACTERIAS

Un tubo de caldo de cultivo es sembrado con un millón de gérmenes jóvenes de estafilococo dorado; cuando el cultivo se ha desarrollado, se agregan unas gotas de las tres esencias ya nombradas. Después de 24 horas a 37°, todas las bacterias han sido destruidas. Si seguimos la experiencia después de agregadas las esencias, tomando muestras del caldo cada 6 horas y resembrándolo en gelosa, tendremos: a las seis horas aparecerán sobre gelosa cultivos secundarios muy modificados; a las 12 horas, en el caldo se nota una autoaglutinación del cultivo, en la gelosa se preciarán unas pocas colonias con su pigmentación característica, mientras que la mayoría aparecerán de un blanco porcelana; a las 18 horas los caldos sembrados aparecen limpidos y sobre gelosa únicamente aparecerán tardíamente colonias en *gota de rosa*. Es preciso hacer notar que el estafilococo dorado es de los más resistentes a la acción de los agentes físicos y químicos.

El bacilo *Subtilis* es más resistente todavía y sin embargo una emulsión espesa de este bacilo es esterilizada a los tres días de haberle agregado unas gotas de esencias de canela y mostaza, a los cuatro días después de haberle agregado esencia de romero.

Estas esencias destruyen, pues, a 37° y en un tiempo muy corto las bacterias más resistentes.

ACCION DE LAS ESENCIAS SOBRE LAS DIASTASAS

Las mismas esencias han sido agregadas a un extracto diastásico de malta, observándose que a los seis días esa diastasa conserva su primitivo poder licuefaciente y amilolítico en el mismo grado de potencia. Luégo las esencias de mostaza, de romero y de canela, no tienen acción ninguna sobre las diastasas.

ACCION DE LAS ESENCIAS SOBRE EL BACTERIOFAGO

Un caldo filtrado que contenga principio lítico contra el Estafilococo, es dejado durante cuatro días a 37° en contacto con las mismas esencias; después de este tiempo, el poder lítico del caldo es tan activo como el de un tubo testigo colocado a la misma temperatura y que no contenga esencias. Así, pues, el Bacteriófago se comporta como las diastasas.

Además, si se somete un cultivo microbiano a los vapores de Formol éste perece; si se somete el principio lítico previamente glicerinado a la acción de los mismos vapores de formol, al fin de la experiencia, el principio lítico es aún activo.

También es preciso observar, según Legroux, que Bacteriófago se comparte del mismo modo que las diastasas, en presencia de un gel de alúmina.

Otro carácter que presenta semejanza con las diastasas es la disociación de la materia muerta que ambos verifican de una manera semejante. Un caldo de cultivo lo esterilizamos agregándole una solución de formol al 0.75 por mil, y dejándolo a la estufa a 37° por 18 horas; después de este tiempo el cultivo no es resemeblable, está perfectamente esterilizado, aunque su aspecto es turbio; al agregar a este caldo el Bacteriófago, el caldo se aclara en 10 horas. Podría pensarse que lo que ha sucedido es una precipitación, mas si coloreamos las bacterias muertas con Eosinato de toluidina, después de una centrifugación cuidadosa, vemos que las bacterias están vacías o huecas como después de una lisis endoplásmica, apreciándose únicamente el ectoplasma de ellas. Así obran también las Diastasas sobre la materia muerta. El Bacteriófago es, pues, capaz de disociar la materia muerta. Puede atravesar el ectoplasma fijado y ejercer su acción sobre el endoplasma de la bacteria.

Esta primera teoría del Bacteriófago es fácilmente combatible, pues jamás se ha visto que las diastasas transmitan su acción en serie; un principio que transmite su acción en serie indefinidamente y que se regenera es indudablemente un principio vivo. René Legroux hace sus experiencias sobre bacterias suficientemente conocidas y de ahí saca conclusiones para probar que el Bacteriófago es una diastasa. ¿Por qué no hace obrar esos aceites esenciales sobre cultivos de otros virus filtrantes, reconocidos como principios vivos y agentes de gran número de enfermedades perfectamente conocidas? Las conclusiones que de ahí se sacaran sí podrían tener un valor real, pues el Bacteriófago, como ya lo sabemos es también un virus filtrante.

La segunda teoría sostiene que el Bacteriófago es un principio químico, vivo, resultante de las mismas bacterias que han sufrido la lisis y se basa en los siguientes hechos que presentan muchos puntos verídicos. Jaumain dice que él ha introducido en tubos cultivos de esta-

filococos y los ha sellado a la lámpara, dejando una cámara pequeña de aire; al cabo de algunos días ha encontrado la emulsión perfectamente clara. Este hecho ha bastado para que algunos observadores sostengan que el fenómeno es debido a *Autolisinas normales*, dependientes de los mismos microbios. Sin embargo cabe observar que estas supuestas autolisinas jamás han podido transmitir su acción en serie.

Bordet y Ciuca sostienen también que el fenómeno se debe a autolisinas normales, pero que, para que el fenómeno se produzca, se necesita un *primum movens* y ese *primum movens* son los leucocitos, por el hecho de haber encontrado gran cantidad de ellos en un exudado peritoneal causado por inyección de colibacilos, y el cual gozaba de notables propiedades líticas. Pero debemos observar que si los leucocitos fueran el *primum movens* del fenómeno, lógicamente debería encontrarse el bacteriófago en la capa de glóbulos blancos que presenta la sangre coagulada de un caballo dador de suero antidisentérico, y la experiencia demuestra que jamás se encuentra el principio lítico ahí.

La tercera teoría, la más aceptada, es la que sostiene que el Bacteriófago es *un principio vivo, extraño a la bacteria*. Sabemos que es un principio vivo, porque goza de un poder de asimilación en medio heterógeno; el Bacteriófago se nutre de bacterias jóvenes, su alimento electivo, a expensas de ellas vive y se multiplica, como se prueba por pasos sucesivos en los cuales su virulencia aumenta. Otra propiedad de los seres vivos es el adaptarse a condiciones adversas del medio y ya hemos visto anteriormente que el Bacteriófago se acostumbra a los antisépticos, a la glicerina, a los ácidos y aún al suero antibacteriófago que se prepara por inoculaciones graduales al animal, de bacteriófagos cuyas propiedades sean suficientemente conocidas. De modo pues que el Bacteriófago es un principio vivo.

APLICACIONES TERAPEUTICAS

Pierre Rosenthal relata en *La Presse Medicale*, sus investigaciones sobre el Bacteriófago, en las cuales tuvo que apartarse bastante de las técnicas aconsejada por D'Hérelle y por Handuroy. En ese estudio interesante trae una lista bastante larga de afecciones tratadas con buen éxito por el Bacteriófago preparado en su laboratorio; entre éstas, cita: 1º Forunculosis, ántrax y otras manifestaciones estafilocócicas, tratadas con el Bacteriófago antiestafilocócico; 2º Afecciones piógenas, como abscesos, flegmones, panadizos, etc., tratados por la mezcla bacteriófágica antiestreptocócica y antiestafilocócica; 3º Infecciones urinares debidas al *colibacilo*, por medio del Bacteriófago anti-coli; 4º Diferentes infecciones intestinales, como enteritis, colitis, síndromes enterorrenales, etc., por medio de la mezcla anticoli, antiparatífico, antidisentérico, antiproteus, antiestafilocócico, antiestreptocócico, y antienterocócico; 5º Infecciones de las vías respiratorias, como coriza,

rinofaringitis, grippe, etc., con la mezcla de Bacteriófagos antiestafilocócico, antiestreptocócico y anticoli.

Anota sin embargo muchos fracasos, aún en los casos en que las bacterias eran perfectamente lisadas *in vitro* por el Bacteriófago correspondiente. No es cierto, pues, como lo afirma D'Hérelle, que todo Bacteriófago activo *in vitro*, lo es también *in vivo*.

M. Camus, asistente del Profesor Lemaitre relata un caso de un hombre de 69 años, atacado de una forunculosis generalizada que llevaba una evolución de 12 días; presentaba múltiples forúnculos en la cara, en el pecho, en la espalda, en las axilas; un ántrax enorme en la nuca y forúnculos en los conductos auditivos y en ambos tragus. Le inyectó 1 c. c. de Bacteriófago al nivel del muslo, le puso inyecciones de lo mismo en la masa del ántrax y alrededor de él, le limpió cuidadosamente los conductos auditivos y le puso mechas empapadas en Bacteriófago. Al día siguiente el ántrax había disminuído considerablemente de volumen, los fenómenos dolorosos se habían atenuado y el pus estaba casi completamente reabsorbido. Le repitió ese día la inyección y los mismos cuidados como el día anterior, notándose una mejoría rápida; así se continúa el tratamiento los días siguientes, anotándose la mejoría absoluta a los cuatro días de empezado el tratamiento.

D'Hérelle cita muchos casos de forunculosis también, que habían resistido tenazmente a todos los otros tratamientos conocidos, aún a la autovacuna, curar en tres días con el Bacteriófago.

El tratamiento en estas forunculosis es muy simple, bastando tres inyecciones como máximum, con 24 o 48 horas de intervalo, de un Stock-bacteriófago.

Entre las afecciones crónicas que se benefician notablemente del Bacteriófago, merecen citarse las producidas por el *Colibacilo* y especialmente cuando se radican en el aparato urinario. Se empieza por aislar el bacilo contenido en las orinas del paciente; después se hacen obrar sobre el cultivo puro de este bacilo las distintas cepas de Bacteriófago que se posean y se aplicará al paciente aquella que haya producido la lisis completa en el tiempo menor. La administración debe hacerse por vía subcutánea y por instilaciones vesicales, pudiendo además agregarse la administración *per os*, para obrar también sobre los bacilos que se encuentran en el intestino, según la práctica seguida por el doctor Campan de Barcelona.

La vía principal que sigue el colibacilo para localizarse en el riñón es la sanguínea, pero para ello deben mediar influencias patológicas, pues es sabido que la sangre obra sobre este bacilo como una solución antiséptica; además deberá haber en el riñón pequeños traumatismos formados por una nutrición defectuosa, para que el colibacilo se

cultive allí como en su medio electivo ayudado por la orina que es un magnífico medio de cultivo para él.

Clínicamente se observan *pielonefritis* colibacilares agudas, fáciles de curar y formas crónicas muy rebeldes. Legueu condena las instilaciones de nitrato de plata por favorecer la formación de cálculos y en cambio aconseja el Bacteriófago en instilaciones visicales y uretrales, como el tratamiento de elección.

Las inyecciones subcutáneas deben estar separadas por un número de tiempo de 48 horas. La dosis será de $\frac{1}{2}$ centímetro cúbico para la primera y segunda inyecciones y de 1 c. c. para la tercera, no siendo necesario aplicar más. Las instalaciones se hacen con una dilución de 10 c. c. a 20 c. c. de cultivo de Bacteriófago, en agua fisiológica y pueden ser repetidas sin inconveniente alguno cada cinco días.

Para la administración *per os* se dan algunos centímetros cúbicos del cultivo de Bacteriófago en medio vaso de agua, todas las mañanas en ayunas; esta administración puede ser repetida cuantas veces se quiera, pero es costumbre administrarlo únicamente durante seis o siete días seguidos.

D'Hérelle cita varios casos de Pielonefritis de colibacilos y entre esos uno muy demostrativo: se trata de una mujer de 32 años, que hacía ocho años sufría de una pielonefritis de colibacilos, rebelde a cuantos tratamientos se le habían hecho. Se practicaron dos inyecciones de Bacteriófago con cuarenta y ocho horas de intervalo, con resultado nulo, como pudo comprobarse en 12 días de observación; entonces se practicó una instilación vesical con 10 c. c. del cultivo de Bacteriófago, diluidos en 50 c. c. de agua fisiológica; cuatro días más tarde las orinas eran perfectamente estériles; todos los síntomas desaparecieron y la mujer continuó perfectamente bien como lo probaron los controles severos a que fué sometida por un lapso muy largo.

En estas afecciones se cuenta una curación del 50%, teniendo en cuenta que la estadística que consulté se basaba sobre casos crónicos rebeldes a todos los otros cuidados terapéuticos, inclusive las autovacunas.

DISENTERIA BACILAR

Entre las enfermedades agudas merece especial atención la Disenteria bacilar, punto de partida de los originales estudios de D'Hérelle. Su tratamiento se ha simplificado notablemente con este nuevo agente terapéutico y la literatura mundial está llena de halagadores resultados. La Disenteria bacilar, siendo una enfermedad esencialmente intestinal, es preciso atacarla directamente en su lugar de desarrollo, por la ingestión del Bacteriófago. En algunos casos es suficiente una dosis única de 1 c. c., para que el enfermo entre en convalecencia franca a las 24 ó 36 horas después.

En el Brasil, país azotado terriblemente por esta enfermedad, se procede del siguiente modo: en presencia de un individuo que presenta la sintomatología clásica, se le administra *per os*, sin examen previo de laboratorio, 1 c. c. de cultivo polivalente de Bacteriófago, repitiendo la dosis a las 24 horas; si después de estas dos dosis no se aprecia ninguna mejoría, la disentería se considera de origen amibiano y entonces se instituye el tratamiento clásico por la emetina.

El Instituto Oswaldo Cruz de Río de Janeiro, basado en una estadística de 10,000 casos tratados por el Bacteriófago, llega a la siguiente conclusión: "El Bacteriófago antidisentérico es el mejor agente terapéutico de las disenterías bacilares. Su acción es superior a la de los otros agentes conocidos, aún a la del suero, pues en la mayoría de los casos los síntomas disminuyen notablemente a las cuatro u ocho horas y el enfermo entra en convalecencia franca a las 24 ó 48 horas después de iniciado el tratamiento".

FIEBRE TIFOIDEA

Aunque Berckerich, J. Smith y Hauduroy citan algunos casos tratados con mediano éxito por el Bacteriófago, sin embargo en esta enfermedad no ha dado los resultados que se esperaban.

PESTE BUBONICA

D'Hérelle cita cuatro casos de peste bubónica tratados con maravilloso resultado por la inyección en pleno bubón, de 1 c. c. de cultivo de Bacteriófago reconocidamente virulento para el bacilo pestoso después de experiencias *in vitro*. Uno de esos casos, que se empezó a tratar a los 5 días de declarada la enfermedad, salió del Hospital perfectamente curado a los 22 días de un tratamiento exclusivo con este agente terapéutico. En otros dos casos en los cuales se inició el tratamiento de una manera más precoz, la fiebre y los demás síntomas cedieron a las 24 horas y la mejoría completa fué también más rápida.

Así pues, el Bacteriófago puede considerarse como el tratamiento específico de esta enfermedad, actualmente rara afortunadamente, localizada únicamente en algunos lugares de la China y de la India, pero de una mortalidad verdaderamente alarmante, como que alcanza un porcentaje del 60% al 95% de los enfermos atacados.

COLERA

Gracias al empleo del Bacteriófago se ha reducido en la India la mortalidad por esta terrible enfermedad del 60% al 8%. El Coronel Morison, del servicio médico de la India, dice que en los pueblos de Assam ha podido reducir su mortalidad del 80% al 10%, gracias al empleo del Bacteriófago en ingestión. Conocido de todos es el poder curativo contra el cólera de las aguas de algunos ríos sagrados de la

India, debido indudablemente al desarrollo del Bacteriófago, por la costumbre que tienen los indúes de arrojar a su seno los cadáveres de los muertos de cólera.

TRATAMIENTO DE ORR EN LAS OSTEOMIELITIS

Maravillosos resultados ha dado el taponamiento con vaselina blanca después de curetaje del foco osteomielítico. Difícil ha sido dar una explicación satisfactoria a este fenómeno altamente benéfico en una afección cuya curación hasta ayer era tan larga, costosa y mortificante.

García Alonso cree que la curación se debe a antagonismos biológicos desarrollados entre las bacterias que infestan el foco purulento. Tenemos el hecho de que la no renovación del taponamiento da lugar al desarrollo de fenómenos de putrefacción claramente manifestados en el olor fétido de los drenajes. Esta putrefacción, debida a gérmenes anaerobios cambia completamente el medio de vida del estafilococo dorado, produciendo principalmente amoníaco que alcaliniza el medio, volviéndolo altamente perjudicial para su desarrollo. La importancia que las asociaciones bacterianas tienen en el curso de una infección es un asunto de gran interés y de trascendencia enorme. Estas asociaciones pueden resultar favorables o desfavorables para el enfermo y su estudio está lleno de promesas. Recuérdese, por ejemplo, cómo según las investigaciones de Weinberg, en una infección gaseosa en la cual actúan cuatro gérmenes anaerobios, el *perfringens*, el *histolítico*, el *vibrión séptico* y el *aerógenes*, basta a veces anular a uno de ellos para que los otros resulten inofensivos. Así también sería posible que el desarrollo de la fermentación pútrida obtenida por la cura de Orr, convirtiera en inofensivos los estafilococos de la osteomielitis, y de esa manera se verificara su curación.

Orr y Albee creen que la curación se debe a la formación del Bacteriófago en el foco séptico, por haberlo encontrado muchas veces en estos focos en vía de curación.

ASOCIACION BACTERIOFAGO-ANTIVIRUS

Conocemos suficientemente los frecuentes fracasos en la terapéutica bacteriofágica, debidos unas veces a que no se emplea un bacteriófago suficientemente virulento, otras a que se trata de una infección múltiple, y debiera entonces usarse un principio lítico polivalente, y por último, las más frecuentes, a que las bacterias atacadas por el Bacteriófago, se defienden, se vuelven refractarias y el suero sanguíneo fabrica sus *antifagos* que neutralizan completamente la acción del Bacteriófago.

Pierre Rosenthal, quien ha estudiado profundamente este problema, propone que se asocie el *Bacteriófago de D'Hérelle al antivírus*

de *Besredka*, que él prepara de la manera siguiente: Se toma un cultivo microbiano sacado de la infección que se va a tratar, se somete a la lisis por el Bacteriófago homólogo, teniendo cuidado que no se verifique una lisis completa, con el objeto de obtener pronto cultivos secundarios. De otra parte hacemos obrar antifagos indirectos sobre las bacterias lisadas de los cultivos primarios y esto en presencia del Bacteriófago homólogo; en estas condiciones, las bacterias que se han vuelto resistentes, continúan desarrollándose. Estas bacterias y las de los cultivos secundarios, las unas y las otras perfectamente resistentes al principio lítico, son cultivadas en caldo; después de una permanencia prolongada en la estufa a 37° son filtradas sobre bujía Chamberland L5, cuidadosamente controladas, obteniendo de esta manera el *antivirus que emplea*.

La aplicación del antivirus así obtenido crea una inmunización local específicamente dirigida contra las bacterias que se han vuelto resistentes al Bacteriófago e impiden su acción, evitando así los frecuentes fracasos que se observan en el tratamiento con el Bacteriófago solo.

* * *

Si el descubrimiento del Bacteriófago no ha llenado todas las aspiraciones que se abrigaban en un principio, pues se llegó a creer que se había encontrado la panacea para todas las dolencias humanas, sí al menos debe considerarse como un agente terapéutico eficaz en gran número de enfermedades, como ya hemos tenido ocasión de ver. Además, es de justicia rendir a D'Hérelle el honor que merece, pues con su descubrimiento despertó un verdadero frenesí de investigación que ha redundado en provecho de la ciencia.

BIBLIOGRAFIA

1. *Le Bacteriophage*.—F. de D'Hérelle.
2. *Le Bacteriophage de D'Hérelle*. Paul Handurog.
3. *Archivos de Medicina, Cirugía y Especialidades*.—Año XII, número 506.
4. *La Presse Medicale*.—Número 40, 17 mayo 1930. Número 22, 24 mayo 1930.
5. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*.
6. *Les Progrès récents en Therapie antiinfectieuse*.—P. Carmot, Tiffenan D'Hérelle, etc.

