

# LUCHA CONTRA EL COLERA

## PRONTUARIO Y GUIA PRACTICA <sup>1</sup>

B. Barua,<sup>2</sup> W. Burrows,<sup>3</sup> y J. C. Gallut<sup>4</sup>

*Este estudio está especialmente destinado a las regiones donde no ha habido cólera durante decenios y donde la amenaza o la aparición de esta enfermedad podría plantear a las autoridades sanitarias problemas con los que no tienen experiencia directa.*

### Características epidemiológicas

Desde 1961 parece estar fraguándose una séptima pandemia de cólera. A partir del sudoeste del Pacífico, la enfermedad hizo su aparición en el Cercano Oriente en 1965 y 1966, y ha llegado al norte y al oeste del Africa y a Europa oriental en 1970. La pandemia está causada por el biotipo El Tor de *Vibrio cholerae*.

Hacia 1960 aún se creía que el cólera se presenta sólo en forma de una infección aguda y frecuentemente fatal, acompañada de diarrea colicuativa; sin embargo, hoy se sabe que la infección es por lo general asintomática o sólo provoca una leve sintomatología diarreica muy parecida clínicamente a la de las shigelosis, salmonelosis, gastroenteritis por *Escherichia coli* e infecciones similares. Esto es especialmente patente en el caso del cólera provocado por el biotipo El Tor, pese a que en ciertos casos esta forma puede cursar con graves manifestaciones que en nada se diferencian de las causadas por el *V. cholerae* clásico. El biotipo El Tor es algo más resistente a las influencias exteriores y a los antibióticos, y sobrevive durante más tiempo en el medio ambiente; sin embargo, no parece que estas

diferencias tengan importancia epidemiológica. Los casos secundarios en las familias son raros.

Los portadores de cólera pueden ser enfermos en período de incubación, convalecientes, contactos o, excepcionalmente, enfermos crónicos. Como la incubación es muy breve (1-5 días), el estado de portador en fase de incubación dura poco tiempo; en cambio, los convalecientes pueden a veces actuar como portadores durante dos o tres semanas. Los contactos sólo excretan vibriones durante un período limitado, probablemente entre cinco días y dos semanas. Los sujetos que se convierten en portadores crónicos después de haber sufrido la enfermedad clínica son raros; entre los pocos casos descritos cabe citar el de una mujer que albergaba vibriones en la vesícula biliar y los excretó intermitentemente durante más de ocho años.

La infección puede transmitirse directamente de persona a persona, pero la forma de transmisión más importante es, con gran diferencia, la propagación a través del medio ambiente y especialmente del agua. En general, los fomites sólo parecen tener una importancia secundaria.

La incidencia estacional es característica en cada región pero difiere de unas zonas a otras, por lo que no puede establecerse una correlación invariable entre las epidemias y los factores climáticos en general. Ni el sexo ni la edad parecen influir en la incidencia;

<sup>1</sup> Suplemento de la publicación "Principios y práctica de la lucha contra el cólera (Cuadernos de Salud Pública No. 40, de la OMS).

<sup>2</sup> Servicio de Enfermedades Bacterianas, OMS.

<sup>3</sup> Profesor de Microbiología, Universidad de Chicago, Chicago, Illinois, Estados Unidos.

<sup>4</sup> Jefe del Laboratorio de Cólera, Instituto Pasteur, París, Francia.

no obstante, se ha observado que al declararse una epidemia en una zona hasta entonces indemne, la enfermedad afecta más a los varones adultos, probablemente a causa de la mayor movilidad de este grupo de población, que a su vez entraña un mayor riesgo de contagio. En las zonas de intensa endemicidad, en cambio, la población está expuesta desde el nacimiento y adquiere así una inmunidad cada vez mayor, por lo que la morbilidad suele ser más alta entre los niños. La incidencia del cólera tiende a ser más elevada en los grupos de nivel socioeconómico más bajo, probablemente a causa de las malas condiciones higiénicas, toda vez que la susceptibilidad individual a la enfermedad no parece estar relacionada con ningún tipo de carencia nutritiva ni con otros factores análogos.

#### Clasificación y características de los vibriones coléricos

El vibrión colérico es una bacteria en forma de bastoncillo ligeramente curvado, gram-negativa, no esporulada y muy móvil gracias a la presencia de un flagelo polar único. Desde el punto de vista nutricional es poco exigente y se multiplica bien en agua de peptona corriente. Es aerobio y su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C. El vibrión colérico es una de las bacterias que proliferan con más rapidez, superando incluso a ese respecto a los bacilos coliformes en las primeras horas de incubación. Su tolerancia a los álcalis es tan elevada que le permite desarrollarse en medios con un pH de 9.2, propiedad que a veces se aprovecha para el aislamiento primario. En general, se asemeja a las enterobacterias por su tolerancia a las sales biliares, etc.

Heiberg ha clasificado los vibriones en seis tipos por su acción fermentativa (con producción de ácido exclusivamente) sobre la manosa, la sacarosa y la arabinosa. Por lo general, aunque no siempre, los vibriones coléricos pertenecen al tipo 1 de Heiberg (fermentación de la manosa y la sacarosa,

pero no de la arabinosa). Otras reacciones bioquímicas, como la formación de oxidasa (prueba de la oxidasa) y de lisina-decarboxilasa, así como la fermentación del manitol (el vibrión da un resultado positivo en las tres pruebas), son útiles para diferenciar las especies de *Vibrio*, en especial los vibriones NAG (no aglutinables), de especies semejantes pero sin relación con ellas (v.g., *Enterobacteriaceae*, *Aeromonas* y *Plesiomonas*).

Desde el punto de vista serológico, el vibrión colérico se diferencia de otros vibriones, tanto en sus formas patógenas (v.g., *V. parahemolyticus*) como en las no patógenas, por su antígeno específico O (termoestable). En cambio, comparte antígenos termolábiles con ciertos vibriones no coléricos. Por consiguiente, su identificación serológica exige el empleo de sueros específicos anti-O. Existen tres antígenos O principales, que constituyen el grupo O-I y que han sido denominados A, B y C. El antígeno A, considerado como el antígeno específico del grupo O-I, se combina con los demás antígenos O dando lugar a los distintos serotipos de vibriones. La combinación antigénica AB corresponde al serotipo Ogawa, la combinación AC al serotipo Inaba y la combinación ABC al raro serotipo Hikojima. Los serotipos Ogawa e Inaba tienen gran importancia en la práctica; aún no se conocen bien las relaciones existentes entre ellos y actualmente se piensa que los serotipos corresponden a cantidades variables de antígenos, como en el caso de *Brucella*, y que el serotipo Inaba procede del Ogawa por pérdida antigénica. También hay razones para pensar que los serotipos pueden presentar modificaciones espontáneas tanto en la naturaleza como en animales de laboratorio exentos de gérmenes. En cualquier caso, la diferenciación de serotipos con antisueros monoespecíficos preparados por absorción con antígenos de serotipos heterólogos constituye un método práctico y de cierto valor epidemiológico.

Los vibriones coléricos, es decir los del grupo O-I, se dividen en diversos biotipos según sus propiedades hemolíticas, su sensibilidad al coleróforo del tipo IV de Mukerjee empleado a la dilución corriente de prueba, su resistencia a la polimixina B y su capacidad para aglutinar los hematíes de pollo. Entre estos criterios diferenciales, la actividad hemolítica parece ser relativamente inestable.

Los vibriones hemolíticos del grupo O-I (también puede haber vibriones hemolíticos en otros grupos O) fueron aislados en 1905 en la estación de cuarentena El Tor (Egipto) y por ello se les denominó vibriones El Tor. Hasta 1938 se consideraba que no intervenían en el cólera humano, pero ese año se encontraron vibriones El Tor patógenos y colerígenos en Sulawesi (Célebes), que después se han extendido por el mundo como agente etiológico de la actual pandemia de cólera.

Originalmente se identificaban los vibriones El Tor del grupo O-I por su actividad hemolítica, pero en la actualidad parecen estar perdiendo esta propiedad (como ha pasado, por ejemplo, en Filipinas); no obstante, se ha mantenido la denominación El Tor. De todas formas, en la mayor parte de las cepas aún se puede observar actividad hemolítica valiéndose de técnicas muy sensibles.

#### Bacteriófagos

El bacteriófago del cólera (coleróforo) fue descrito por primera vez en 1918 por d'Herelle. Desde 1920 se sabe que con frecuencia coexiste en el enfermo con vibriones coléricos susceptibles; en estos casos, en las placas de cultivo donde se hace el aislamiento primario aparecen colonias de aspecto "roído" o "apolillado", siempre y cuando el medio de cultivo no contenga algún agente fago-inhibidor como las sales biliares. Desde el descubrimiento de los fagos templados se sabe también que casi todas las cepas del biotipo clásico de *V. cholerae* y muchas de las cepas El Tor aisla-

das son lisogénicas. La fagotipia de los vibriones coléricos iniciada por Asheshov no ha resultado tan útil como en algunas otras especies de bacterias; sin embargo, Mukerjee ha aislado cuatro grupos de coleróforos que permiten dividir el biotipo clásico en cinco subtipos, y cuatro grupos de fagos El Tor con los cuales este biotipo se puede subdividir en seis subtipos.

Mukerjee ha señalado también que el coleróforo del grupo IV permite diferenciar el biotipo clásico de las cepas El Tor, incluso aunque estas no presenten algunas de sus características típicas, en especial la actividad hemolítica. En efecto, mientras que el vibrión clásico es sensible al fago IV, que lo lisa a la dilución corriente de prueba, el biotipo El Tor es resistente. La sensibilidad al fago del grupo IV es pues una de las características diferenciales más importantes, y probablemente una de las más estables de los biotipos de vibrión colérico.

Los primeros estudios sobre los coleróforos estaban motivados sobre todo por su posible valor terapéutico; sin embargo, como los resultados eran siempre descorazonadores, los investigadores perdieron interés por la fagoterapia del cólera hasta que en fecha reciente (1963) los especialistas rusos se han vuelto a ocupar del problema. Tanto en la profilaxis como en el tratamiento se han señalado resultados alentadores; sin embargo, recientes estudios realizados en Paquistán Oriental por investigadores soviéticos en colaboración con especialistas americanos y paquistaneses no han confirmado las primeras observaciones y hacen pensar que la fagoterapia del cólera carece prácticamente de utilidad.

#### Diagnóstico de laboratorio

1. Tomar la muestra por medio de una sonda de caucho, una varilla de vidrio, un tubo de vidrio romo y provisto de un ojal, un escobillón rectal o una torunda de algodón si las heces se encuentran en un recipiente.

2. Transportar la muestra en solución

de Venkatraman-Ramakrishnan, medio de Cary-Blair, agua de peptona alcalina, caldo de taurocolatotelurito o bien en tiras de papel secante.

3. Utilizar agua de peptona alcalina para el enriquecimiento. Incubar a 37° C durante 6 a 8 horas.

4. Después del enriquecimiento, sembrar directamente la muestra en estrías sobre una placa de agar TCBS y agar nutritivo, de agar TCBS y agar con sales biliares o de agar TCBS y agar gelatina. Incubar la placa durante toda la noche.

5. Practicar una prueba preliminar de aglutinación en portaobjeto con suero polivalente (grupo O).

6. Efectuar el aislamiento en agar hierro de Kligler o en tubo inclinado de agar. Incubar durante toda la noche.

7. Confirmar la prueba de aglutinación en portaobjeto con sueros polivalentes y de tipificación:

A. Si el resultado es positivo, determinar el grupo de Heiberg y el biotipo del vibrión mediante las siguientes pruebas:

- a) fermentación de la manosa, la sacarosa y la arabinosa;
- b) hemaglutinación con hematíes de pollo o de carnero;
- c) sensibilidad a la polimixina B, utilizando un disco de 50  $\mu\text{g}$  o una concentración de 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en el medio;
- d) sensibilidad al colerófago del grupo IV a la dilución corriente de prueba;
- e) actividad hemolítica, por cultivo del microorganismo en caldo nutritivo y en caldo de infusión de corazón.

Los vibriones coléricos de ambos biotipos suelen pertenecer al grupo 1 de Heiberg, es decir, fermentan la manosa y la sacarosa pero no la arabinosa. Los dos biotipos presentan las siguientes características:

	<i>Clásico</i>	<i>El Tor</i>
Hemaglutinación directa:	negativo	positivo
Sensibilidad a la polimixina B:	sensible	resistente
Sensibilidad al colerófago del grupo IV:	sensible	resistente

B. Si el resultado es negativo puede tratarse de un vibrión NAG o de un vibrión no colérico, en cuyo caso habrá que diferenciarlo de otras especies muy afines mediante las pruebas de la oxidasa, la lisina y la ornitina-decarboxilasas, la arginina-dehidrolasa, la fermentación de manitol y la prueba de oxidación-fermentación (véase los cuadros 1 y 2 del Capítulo 5 en *Cuadernos de Salud Pública* 40).

#### Aislamiento del vibrión colérico

##### 1. En el agua

Las muestras se toman en un frasco estéril de un litro en el que, antes de llevarlo al autoclave para su esterilización, se introducirán dos cucharaditas de sal común. Siempre que se teman demoras en el análisis de laboratorio, antes de enviar la muestra de agua se ajustará su pH a 9.2 con solución N de NaOH.

a) *Filtración simple.* Pasar de 300 a 1,000 ml de la muestra de agua a través de un filtro Seitz (disco de 6 cm) por succión lenta. Plegar a continuación el disco e introducirlo en un frasco de boca ancha con 50 ml de agua de peptona alcalina, ajustar el pH a 9.2, incubar el cultivo a 37° C durante 6 horas y, por último, sembrarlo en placas de medios apropiados.

b) *Filtración en filtro Millipore.* Colocar el filtro en su soporte. Después de filtrar aproximadamente un litro de la muestra de agua, tratar el papel de filtro como se indica en a) o depositar el disco sobre la superficie de un medio sólido selectivo y contar las colonias con ayuda de un microscopio de disección tras una incubación mínima de 6 horas.

c) *Doble enriquecimiento en agua de peptona.* La toma de muestras se hará en frascos de 280 ml previamente esterilizados en los que se introducirán 20 ml de agua de peptona al 10% con NaCl al 5%. Recoger 200 ml de agua en cada frasco y remitirlos al laboratorio. Ajustar el pH a 9.2 e incubar

durante toda la noche el contenido del frasco; transferir a continuación 1-2 ml a 10 ml de agua de peptona alcalina, e incubar durante 6 horas y proceder a la siembra en placas.

El enriquecimiento en agua de peptona parece un método muy apropiado y práctico para los laboratorios corrientes. En manos expertas, el empleo del filtro Millipore permite obtener resultados cuantitativos.

### 2. En las aguas residuales

Diluir la muestra en suero salino estéril de manera que pueda filtrarse a través de una gasa esterilizada. Proceder con el filtrado del mismo modo que con una muestra de agua.

### 3. En los alimentos

Tomar muestras al azar de las partes expuestas del alimento. Triturar las muestras en agua de peptona alcalina y a continuación proceder con ellas del mismo modo que con las muestras de agua. Si se trata de alimentos líquidos, filtrarlos y operar seguidamente como si fueran muestras de agua.

### 4. En los fomites

Lavar las superficies expuestas, filtrar el agua con que se han lavado y proceder con ella como con una muestra de agua.

### 5. En las moscas

a) *Superficies externas.* Lavar una muestra de las moscas capturadas en la localidad con agua de peptona alcalina; incubar esta durante 6 horas y, a continuación, sembrarla en placas.

b) *Contenido intestinal.* Lavar una muestra de las moscas capturadas con alcohol al 70%, enjuagarla tres veces en suero salino estéril y triturarla en agua de peptona alcalina; proceder a continuación como antes se ha descrito.

## Patogenia

La infección colérica del hombre se hace por vía oral, mediante la ingestión de aguas y alimentos contaminados por *V. cholerae*. Como los vibriones son acidosis sensibles parece poco probable que puedan llegar al intestino delgado en cantidad suficiente para establecer allí un foco de infección, a menos que ceda temporalmente la barrera que les opone la acidez gástrica. Al multiplicarse, los vibriones elaboran y liberan una exotoxina cuyos efectos sobre los mecanismos secretores de los tejidos intestinales se conocen mal; lo que sí se sabe es que provoca o acelera el paso del agua y de los iones desde los tejidos hasta la luz del intestino, dando lugar a una secreción neta de líquido isotónico que se manifiesta en forma de diarrea acuosa. No se ha podido observar ninguna lesión histológica en los capilares ni en otras estructuras del intestino. Según estudios recientes, la reabsorción de sodio y de agua no está perturbada en el cólera y, en contra de lo que antes se pensaba, tampoco se produce una inhibición de la "bomba de sodio".

La pérdida gastrointestinal masiva de líquidos isotónicos muy pobres en proteínas pero ricos en bicarbonato y potasio provoca deshidratación con hemoconcentración, choque hipovolémico y acidosis metabólica por pérdida del bicarbonato. Si todos estos trastornos se prolongan acaban por perturbar la función renal y la acidosis se agrava cada vez más. La depleción de potasio es menos grave en los adultos; el trastorno de la función renal limita en realidad la pérdida de este ion. En cambio, la hipopotasemia tiene peores consecuencias en los niños, en los que puede llegar a provocar un íleo paralítico y arritmias cardíacas; en estos casos es necesario reponer las pérdidas añadiendo potasio a los líquidos de rehidratación oral o parenteral.

## Tratamiento

A los enfermos de cólera se les debe aislar y tratar en una sala especial de los hospitales

para enfermos infecciosos. Siempre que haya un riesgo de epidemia se adoptarán de antemano las disposiciones pertinentes. En las zonas rurales pueden establecerse hospitales improvisados en las escuelas o en tiendas de campaña.

#### *Material indispensable*

1. Soluciones de rehidratación, con sistemas de administración que puedan desecharse una vez usados.

2. Báscula.

3. Camas especiales para coléricos y cubos graduados.

4. Antibióticos.

5. Gráficos de tratamiento (con indicación de ingresos y pérdidas de líquido).

#### *Precauciones que ha de tomar el personal hospitalario*

1. Aunque las infecciones contraídas en el laboratorio o el hospital son sumamente raras, es indispensable que el personal observe escrupulosamente las reglas fundamentales de higiene personal.

2. Todo el personal debe estar vacunado contra el cólera, pero no es necesario que tome antibióticos.

3. Los médicos y las enfermeras se pondrán blusas blancas al entrar en la sala de los coléricos y se las quitarán antes de salir.

4. El personal se abstendrá de comer y de beber en la sala.

5. Las personas que hayan estado en contacto con los enfermos o sus ropas se lavarán después cuidadosamente las manos con jabón y desinfectantes.

#### *Tratamiento de los adultos y de los niños que pesen más de 20 kg*

1. Efectuar un breve reconocimiento clínico del enfermo para confirmar el diagnóstico.

2. Siempre que sea posible se pesará al sujeto, pues la cantidad de líquidos necesaria para la rehidratación inicial de los casos con

diarrea profusa y colapso puede ascender al 10% del peso corporal.

3. Instalar al enfermo en una cama de coléricos con un cubo debajo. Si no hay más remedio que dejar a los enfermos en el suelo, excavar un agujero bajo sus nalgas y colocar en él un recipiente de barro.

4. Obtener una muestra rectal con un escobillón (o una muestra de las heces emitidas) para los análisis de laboratorio.

5. Tanto para la rehidratación inicial como para el tratamiento de mantenimiento se considera que el líquido más cómodo es la solución de lactato de Ringer, tal y como se encuentra en el comercio.

6. Rehidratación inicial. Efectuar cuanto antes la rehidratación intravenosa valiéndose de una aguja No. 18. Administrar aproximadamente un litro de líquido en los primeros 15 minutos y, a continuación, un litro cada 30 a 45 minutos. Para la rehidratación inicial pueden necesitarse en total de 2 a 5 litros.

7. Iniciar el tratamiento antibiótico con tetraciclina (500 mg cada 6 horas durante 2 a 3 días) tan pronto como cesen los vómitos, lo cual suele suceder al cabo de unas 3 horas.

8. Mantenimiento del equilibrio. Medir el volumen de las heces evacuadas cada 6 a 8 horas y administrar por vía intravenosa la cantidad de líquidos necesaria para compensar las pérdidas y mantener el equilibrio hidroelectrolítico. Puede obtenerse el mismo resultado administrando una solución oral de mantenimiento (glucosa 21.6 g, NaCl 3.50 g y bicarbonato sódico 2.52 g por litro de agua), a razón de 1.5 volúmenes por cada volumen de heces emitido en las 6 horas precedentes.

9. Inscribir cuidadosamente en un gráfico de tratamiento los volúmenes administrados y los evacuados.

10. Cuando la reposición de líquido es correcta, la tensión arterial, el pulso y la elasticidad cutánea se normalizan, el enfermo se siente mejor y la diuresis se resta-

blece. La determinación de la densidad del plasma es útil aunque no indispensable.

11. A los enfermos sometidos a una terapéutica de mantenimiento intravenosa se les debe recomendar que beban pequeñas cantidades de agua, de té o de leche de coco; esta última es rica en potasio.

12. Reanudar el régimen normal de alimentación tan pronto como lo desee el enfermo.

13. Proseguir la reposición de líquidos hasta que cese la diarrea. Cuando se administren antibióticos, a veces no es necesario prolongar la hospitalización más de tres días.

14. El reemplazamiento del potasio no es esencial en los adultos; ahora bien, si se considera necesario pueden administrarse, tres veces al día, 10 ml previamente diluidos de una solución que contenga 100 g de acetato de potasio, 100 g de citrato de potasio y 100 g de bicarbonato de potasio por litro de agua. Otra posibilidad es hacer beber al enfermo unos 170 ml de leche de coco por litro de heces perdidas.

15. En los casos corrientes de cólera no es probable que aparezcan complicaciones (reacciones pirógenas, acidosis y deshidratación persistentes, insuficiencia renal, edema pulmonar agudo, hipopotasemia o hiperhidratación) si se efectúa un tratamiento correcto; la mortalidad tampoco debe exceder de 1 por ciento.

#### *Tratamiento del cólera infantil*

1. Los niños de menos de cinco años de edad (y de menos de 20 kg de peso) necesitan mayores cuidados, pues soportan peor la deshidratación y están más predispuestos a las complicaciones (hipoglucemia, convulsiones, edema cerebral o íleo paralítico). La concentración de sodio en las heces es más baja en los niños que en los adultos con cólera y, al mismo tiempo, la rehidratación presenta mayores dificultades técnicas.

2. Es esencial llevar un registro minucioso del peso corporal, del volumen de las heces y de los líquidos administrados. Du-

rante el tratamiento habrá que controlar cada cuatro horas la frecuencia y el volumen del pulso, la tensión arterial, la elasticidad de la piel, el estado de conciencia, el edema facial, la función pulmonar y la diuresis a fin de verificar si la reposición de líquidos es suficiente.

3. Los líquidos se pueden inyectar en las venas epicraneales mediante el instrumental pediátrico adecuado o en las venas yugular o femoral cuando se trata de niños gravemente enfermos. Conviene utilizar agujas cortas y de pequeño calibre (Nos. 22 ó 24).

4. La solución más práctica y que mejores resultados da es el lactato de Ringer.

5. Rehidratación inicial. En un niño gravemente enfermo y en estado de choque, el déficit de líquidos es aproximadamente del 10%; si la tensión es baja pero el estado de conciencia es normal, el déficit puede evaluarse en un 8%, mientras que en los casos de diarrea ligera con elasticidad cutánea reducida y taquicardia, pero un estado de conciencia normal, el déficit equivale al 5 por ciento. El volumen necesario para la rehidratación, en mililitros, puede calcularse aproximadamente multiplicando el peso en kg por 10 veces el déficit de líquido expresado en tanto por ciento.

6. El tratamiento antibiótico con tetraciclina (50 mg/kg/día) se debe iniciar tan pronto como cesen los vómitos. El antibiótico se administrará en cuatro dosis fraccionadas durante dos o tres días en forma de una suspensión líquida.

7. El mantenimiento del equilibrio se hará administrando por vía intravenosa lactato de Ringer en un volumen inferior en un 25% aproximadamente al de las heces evacuadas. Según algunos clínicos, los resultados de la administración oral de líquidos son menos satisfactorios que en el adulto.

8. Tan pronto como cesen los vómitos se permitirá al enfermo que beba sin restricciones agua glucosada al 5 por ciento.

9. La reposición del potasio puede hacerse de la misma forma que en el adulto,

pero sin olvidar que en el niño es más importante.

10. La administración demasiado rápida de líquidos puede provocar convulsiones y debe evitarse. El estado estuporoso prolongado puede ser signo de hipoglucemia, en cuyo caso puede prevenirse añadiendo glucosa a las soluciones orales o intravenosas. Al administrar los líquidos también habrá que evitar la hiperhidratación.

### Inmunología del cólera

La curación del cólera va acompañada de la aparición de anticuerpos séricos aglutinantes y vibriocidas. El suero de convalecientes parece contener además un anticuerpo anti-factor de permeabilidad vascular (FP) que se manifiesta por la neutralización de la intradermorreacción provocada con preparaciones acelulares; también contiene anticuerpos que neutralizan la enterotoxina causante del paso del agua y de los iones desde los tejidos a la luz intestinal. Aún no se sabe con certeza cuál es la función del FP en la patogenia de la enfermedad ni si es o no identificable con la enterotoxina.

Al restablecerse el enfermo los títulos de anticuerpos séricos disminuyen con bastante rapidez; así pues, al cabo de unas semanas es dudoso el valor del serodiagnóstico retrospectivo. En las regiones donde abunda la brucelosis, la existencia de factores antigénicos comunes a *V. cholerae* y *Brucella* dificulta la interpretación de los títulos séricos de aglutininas y de anticuerpos vibriocidas, a menos que utilicen sueros apareados. Como los anticuerpos anti-FP parecen formarse en respuesta a la infección, pero no a la inmunización con las vacunas actuales, algunos autores consideran que permiten diferenciar la respuesta inmunitaria a la vacuna de la respuesta a la infección.

El vibrión colérico produce diversas toxinas que se han clasificado en tres tipos (1, 2 y 3) según su termoestabilidad y su carácter dializable o no dializable. La toxina o las toxinas del tipo 1 son termoestables

(hasta 100° C), no son dializables y son ricas en hidratos de carbono; se las considera análogas a la endotoxina del tipo Boivin, letal para el ratón y cuyo carácter citotóxico se manifiesta en el embrión de pollo y en los cultivos tisulares. La toxina o toxinas del tipo 2 son termolábiles (56° C durante 10 minutos) y, en estado bruto, no atraviesan las membranas dializantes de celofán ni los filtros de membrana que retienen un peso molecular de 10,000; estas endotoxinas se difunden libremente a partir de la célula bacteriana intacta, a diferencia de las del tipo 1 que sólo se liberan en forma soluble por disolución de la célula bacteriana. La toxina del tipo 2 comprende una toxina productora de diarrea (enterotoxina) y la actividad del FP. La toxina o toxinas de tipo 3 son termoestables (100° C), se difunden libremente a partir de la célula bacteriana y se dializan con facilidad; la inhibición del transporte de sodio en el epitelio del sapo o de la rana por las toxinas del tipo 3 no es más que un artefacto debido a la presencia del ion amonio.

La existencia de infecciones asintomáticas indica que la inmunidad antitóxica a la enterotoxina del cólera es relativamente importante, es decir, que es lo suficientemente activa para prevenir las manifestaciones diarreicas de la infección. Por consiguiente, hoy se cree que la inmunidad efectiva contra el cólera tiene un componente antibacteriano y un componente antitóxico, el primero de los cuales sirve probablemente para inhibir o prevenir la colonización del intestino delgado y el segundo para neutralizar la actividad de la toxina productora de diarrea.

### Vacunas anticoléricas

La vacuna anticolérica está constituida por una suspensión de vibriones coléricos muertos en suero salino, a razón de unos 8,000 millones de bacterias por ml. Como agente vibriocida y conservador se utiliza generalmente el fenol, pero también pueden emplearse el formaldehído y ciertos com-

puestos orgánicos de mercurio como el tiormeral, o incluso matar los vibriones por calentamiento moderado (56° C durante 30 minutos). La vacuna es bivalente, es decir contiene los serotipos Ogawa e Inaba a partes iguales. El vibrión usado suele ser el del cólera clásico, pero también se ha empleado el biotipo El Tor. La vacuna preparada con el vibrión clásico parece ser igualmente eficaz contra ambos tipos de infección. Para normalizar las vacunas se utiliza la prueba de protección del ratón, pero si esta es impracticable se puede recurrir a la de formación de anticuerpos (aglutininas, anticuerpos vibriocidas) en el conejo. La vacunación se hace de preferencia inyectando por vía subcutánea o intramuscular dos dosis, la primera de 0.5 ml y la segunda de 1.0 ml, separadas por un intervalo de 7 a 28 días; en los niños de menos de 10 años las dosis deben reducirse a 0.1 y 0.3 ml respectivamente. Para la vacunación en masa en casos de epidemia puede utilizarse una sola dosis de 1.0 ml; en las zonas de endemicidad la dosis única puede ser casi tan eficaz como la pauta de dos dosis.

Las actuales vacunas anticoléricas desencadenan una respuesta inmunitaria antibacteriana; en cambio, la respuesta antitóxica es escasa o nula. En los ensayos prácticos se ha visto que estas vacunas confieren una protección apreciable, aunque desigual, contra la infección natural; cabe suponer, pues, que la inmunidad antibacteriana desempeña un papel importante en la protección. Todavía no se dispone de datos análogos sobre la inmunidad antitóxica en el hombre, pero en el perro se ha podido demostrar que interviene en la protección contra la infección experimental.

La inmunidad producida por la vacuna sólo dura algunos meses; se considera que, todo lo más, puede llegar a medio año. En cuanto a la inmunidad que probablemente deja la enfermedad natural no es fácil precisar ni su duración ni su eficacia a causa de la baja incidencia del cólera y, por consi-

guiente, del escaso riesgo de reinfección. Aunque las vacunas anticoléricas sólo confieren una protección parcial y pasajera, en caso de epidemia está perfectamente justificado su empleo, en conjunción con otras medidas sanitarias, para reducir el número de casos.

#### Saneamiento del medio

El agua es el principal vehículo de transmisión del cólera. En los sistemas de abastecimiento hídrico de los centros urbanos, habrá que vigilar las zonas de captación, las corrientes de agua y los pozos, manantiales y depósitos a fin de evitar la contaminación inicial del agua por los efluentes de alcantarillas y fosos sépticos, letrinas mal construidas y hábitos antihigiénicos de defecación o de eliminación de las deyecciones. Lo mejor es evitar que haya viviendas en las inmediaciones de los sistemas de abastecimiento de agua y, si el agua se toma de un río, verter los efluentes contaminantes por debajo del punto de captación. Toda corriente de agua debe ser objeto de una estricta vigilancia, al menos en un tramo de 500 m aguas arriba y 50 m aguas abajo del punto de captación. También hay que vigilar ininterrumpidamente el sistema de distribución para evitar su contaminación a través de grietas y fisuras, y mantener una presión continua que impida todo refluo, sobre todo en la parte periférica de la red. Importa asimismo vigilar la concentración de cloro mediante la toma de muestras en puntos periféricos y, como en las situaciones de peligro habrá que aumentarla, mantener siempre una reserva adecuada de ese producto. La concentración usual de cloro libre (0.2-0.4 mg/litro) resulta insuficiente en tales circunstancias y es absolutamente necesario aumentar las dosis aunque ello suscite protestas por parte de los consumidores. La cloración de urgencia se puede efectuar en las estaciones elevadoras o en otros puntos apropiados. Cuando no se disponga de cloro gaseoso en cantidad suficiente pueden emplearse aparatos distri-

buidores de soluciones cloradas. En las barriadas pobres, donde suele ser deficiente el abastecimiento de agua, así como en los lugares públicos, hay que vigilar estrechamente el agua que se consume, practicando determinaciones de la concentración de cloro y exámenes bacteriológicos, por tratarse de puntos especialmente peligrosos para la propagación del cólera. La fabricación de hielo y de aguas embotelladas exige las mismas precauciones que se aplican al agua de bebida; en ambos casos es esencial el análisis bacteriológico.

Más difícil es la vigilancia del abastecimiento de agua en las zonas rurales. Los pozos excavados se pueden desinfectar con cloro introduciendo en el agua del pozo, a un metro o más de profundidad, un doble recipiente cilíndrico con una mezcla de arena e hipoclorito cálcico. En los pequeños pozos domésticos este dispositivo da buenos resultados durante dos o tres semanas y sólo será necesario renovarlo si transcurrido ese tiempo persiste el peligro. Los pozos taladrados y los manantiales serán sometidos a una vigilancia estrecha, procurando sobre todo descubrir resquebrajaduras o grietas por donde pudiesen penetrar las aguas superficiales contaminadas. Las aguas de superficie ofrecen dificultades especiales por contaminarse con facilidad y, en consecuencia, son las fuentes de agua potable menos convenientes. Se hará todo lo posible por tratar al menos el agua que se utiliza para la bebida y la cocina, bien clorándola cuando se disponga de hipoclorito o bien hirviéndola antes de usarla. Conviene vigilar las condiciones en que se conserve el agua así tratada. En los casos de urgencia pueden utilizarse equipos portátiles de tratamiento, pero sólo a título provisional y sin pretender que sustituyan a las medidas permanentes de higiene. En cualquier caso, conviene que todas las zonas repetidamente expuestas a epidemias dispongan de equipos portátiles y mantenerlos siempre dispuestos para su uso. También son útiles en casos de urgencia las cisternas

montadas en camiones o remolques y provistas de bombas, pese a que sólo permiten asegurar el abastecimiento a escala relativamente limitada y durante poco tiempo.

Después de la vigilancia del abastecimiento de agua, la medida más importante de prevención del cólera es la construcción y el mantenimiento de un buen sistema de alcantarillado. Como las deyecciones humanas son la única fuente de contaminación del agua potable por los vibriones coléricos, la evacuación de los efluentes de manera que haga imposible la contaminación masiva del agua potable es un asunto de la máxima importancia en los centros urbanos, donde por la gran cantidad de excreta que hay que eliminar es indispensable disponer de una red de alcantarillado y de las correspondientes instalaciones depuradoras. Es evidente que la infección colérica se propagará con gran facilidad si no se hace ningún tratamiento de los efluentes y se evacúan grandes cantidades de aguas residuales en ríos, por ejemplo, de los que se abastecen poblaciones situadas aguas abajo. Por consiguiente, cualquier tipo de tratamiento que se haga es preferible a la simple evacuación de los desechos intactos.

Aunque el vibrión colérico es incapaz de competir con otros microorganismos saprófitos, se ha comprobado que incluso en las aguas residuales bien tratadas puede ser necesaria la cloración para asegurar la eliminación de todos los vibriones. Las aguas residuales utilizadas para el riego pueden contaminar el agua potable, así como las hortalizas y otros alimentos que con frecuencia se consumen crudos. Del mismo modo, el empleo de los excrementos como abono constituye otra fuente aún más peligrosa de infección colérica, pues aparte de que no están diluidos pueden contaminar el medio ambiente al derramarse de los recipientes empleados para el transporte. Así pues, en las zonas afectadas por el cólera se prohibirá la recogida y el empleo de las deyecciones con ese fin.

Cuando no existen redes de alcantarillado, como pasa en el medio rural, la evacuación de excreta debe hacerse en letrinas convenientemente situadas. Las letrinas se deben construir en lugares más bajos que los puntos de captación de agua (v.g., pozos) de las inmediaciones, teniendo además en cuenta la naturaleza del suelo. En los terrenos rocosos y calcáreos, por ejemplo, las grietas y fisuras pueden facilitar la contaminación no sólo de los pozos excavados sino también de los taladrados. Además, será necesario desinfectar periódicamente las letrinas con cloruro de calcio u otras sustancias semejantes que liberen cloro.

Especial atención merece el problema de la evacuación de excreta en los establecimientos públicos (hospitales, mercados, restaurantes, etc.), ya que en ellos la transmisión de la infección puede dar lugar a una generalización de la enfermedad. Conviene asimismo extremar la vigilancia de los alimentos y de los lugares donde estos se venden.

### Vigilancia y medidas de lucha

La vigilancia del cólera se ve dificultada por el hecho de que la mayor parte de los países afectados no disponen de suficientes servicios sanitarios generales y de laboratorio. Otra dificultad proviene de que la infección por *V. cholerae* provoca una elevadísima proporción de casos asintomáticos o que sólo se manifiestan por una ligera diarrea. No obstante, todos los países afectados por el cólera tienen establecido algún sistema de vigilancia. Pese al carácter fragmentario de la información básica sobre la prevalencia del cólera, actualmente se ha llegado a la conclusión de que la actual pandemia se ha desarrollado durante el período 1961-1970 a partir del sudoeste del Pacífico y del sudeste asiático, propagándose por Afganistán y el Cercano Oriente hasta el sur de la URSS, Africa y Europa (véase el Capítulo 4). La extensión de la pandemia sólo se podrá frenar mediante una vigilancia ininterrumpida y

la aplicación racional de medidas de prevención y de lucha. Se ha demostrado asimismo que si bien no es posible prevenir la introducción del cólera en un país, puede limitarse su difusión en él mejorando las condiciones sanitarias del medio y manteniendo una vigilancia intensiva. La aplicación rigurosa de las medidas de vigilancia adquiere especial importancia en los países en desarrollo amenazados por el cólera, pues facilita el descubrimiento de la infección antes de que se extienda y escape a toda intervención. La rápida notificación de los brotes epidémicos permitirá a la Organización Mundial de la Salud desempeñar una utilísima función de información de los Estados Miembros, manteniéndoles al corriente de la verdadera situación epidemiológica en los países afectados.

### *Fase preparatoria o de alerta*

Los países amenazados por el cólera o donde este es endémico deben establecer comités nacionales y provinciales de vigilancia y lucha anticólerica, entre cuyos miembros deben figurar directivos y expertos de los ministerios interesados y representantes de la Cruz Roja (o de la Media Luna Roja) y de otros organismos de beneficencia. Estos comités tendrán la misión de proponer las medidas idóneas, dirigir las diversas actividades dentro del país y coordinar la asistencia internacional y bilateral.

Los comités de los países amenazados deberán investigar las posibles vías de entrada de la infección y cerciorarse de que los laboratorios de las regiones vulnerables cuentan con todo lo necesario en materia de equipo, productos químicos, medios de diagnóstico y sueros, y de que se dispone de los medios de tratamiento requeridos (camas especiales para coléricos, soluciones rehidratantes y antibióticos). Deben asimismo constituir equipos de bacteriólogos, epidemiólogos, clínicos e ingenieros sanitarios o técnicos de saneamiento, a los que se adiestrará en las medidas de lucha antico-

lérica, y establecer puestos periféricos o equipos móviles provistos del material necesario (v.g., medios de transporte) para las encuestas y la recogida de muestras.

Para sacar el máximo partido de las vacunas anticoléricas es indispensable utilizarlas atinadamente (véase el Capítulo 13). La vacunación nunca se debe aplicar con miras políticas sino con la finalidad de reducir el número de casos agudos en una situación epidémica. Siempre que haya una amenaza de cólera habrá que vacunar a los residentes en la proximidad de los territorios infectados y en las zonas costeras, así como a los grupos que viven hacinados o en malas condiciones de saneamiento. Se vacunará asimismo a otros grupos especialmente expuestos como el personal médico y paramédico, los viajeros, los funcionarios de aduanas, etc. En los países endémicos ya se sabe por experiencia qué grupos de población y qué zonas son más vulnerables y deben recibir prioridad. La fase preparatoria es el momento adecuado para mejorar los sistemas de abastecimiento de agua y de evacuación de excreta y para informar al público sobre las vías de propagación del cólera y los medios de prevención; a este respecto se insistirá más en la importancia de la higiene personal y del saneamiento que en la vacunación, cuyo valor es limitado. También habrá que ocuparse de ciertas prácticas antihigiénicas típicas de determinadas localidades, como el empleo de los excrementos como abono.

Tanto a los médicos particulares como a los funcionarios de salud pública se les mantendrá al corriente de la situación y se les proporcionará la información técnica que necesiten. Además, se tomarán las disposiciones pertinentes para el envío de muestras, los desplazamientos de los grupos móviles y el transporte de los enfermos, y se establecerá un sistema de comunicación para coordinar las diferentes actividades (por ejemplo, entre los epidemiólogos que trabajan sobre el terreno, los laboratorios, los hospitales y

el comité coordinador central). Habrá que cerciorarse de que se dispone de suficientes reservas de vacunas, soluciones rehidratantes, dispositivos de perfusión, jeringas desechables, agujas, antibióticos, productos químicos y reactivos de laboratorio, y desinfectantes. Pueden ser útiles los inyectores de chorro con boquillas especiales para la administración intramuscular, siempre que se disponga de personal capacitado para su empleo.

El comité nacional puede adoptar disposiciones para que la Organización Mundial de la Salud facilite lo más esencial en materia de equipo, productos químicos, vacunas, soluciones rehidratantes, etc., en forma de donativos o contra reembolso. También se puede solicitar ayuda para la formación del personal médico y paramédico del país. La OMS podrá atender más fácilmente estas solicitudes si se la mantiene informada de la verdadera situación epidemiológica del país con respecto al cólera.

Los países con medios para fabricar líquidos rehidratantes deberán aumentar su producción. Los que no estén en ese caso pueden solicitar por conducto de la OMS la asistencia técnica y los suministros necesarios para iniciar la fabricación.

#### *Período de invasión*

El descubrimiento de un caso confirmado de cólera debe ir seguido inmediatamente de las siguientes medidas: notificación, hospitalización del enfermo, estudio bacteriológico de los familiares y contactos domésticos, administración profiláctica de antibióticos a los contactos más íntimos (y, si es posible, aislamiento de los mismos a domicilio), vacunación de la población de la zona infectada de la región circundante (en forma de círculos concéntricos) y búsqueda y aislamiento de nuevos casos y de sus contactos.

A raíz del descubrimiento del primer caso se hará una encuesta epidemiológica bien organizada para descubrir la fuente de infección y, si es posible, eliminarla. Im-

porta sobre todo asegurar el abastecimiento de agua de la población con agua de buena calidad y organizar un sistema higiénico de eliminación de aguas residuales; también hay que prestar atención a la educación sanitaria del público a fin de mejorar la higiene personal y alimentaria. Al mismo tiempo se repartirán gratuitamente antisépticos para desinfectar las letrinas, los desagües y las viviendas infectadas y sus alrededores. Siempre que sea posible se prohibirán las reuniones y festejos públicos, pero si las costumbres y los rituales locales impiden tomar esa medida se adoptarán precauciones para prevenir la propagación de la enfermedad. Por último, se pondrá especial cuidado en la manipulación de los cadáveres y se desinfectarán o destruirán las ropas y los utensilios de los enfermos.

Durante varios meses después de terminada la epidemia se proseguirá la investigación bacteriológica de vibriones en todos los casos de diarrea, con el fin de descubrir posibles casos nuevos con sus contactos y aislarlos y tratarlos en consecuencia.

La OMS ha establecido un plan de ayuda de urgencia para las epidemias. La Organización cuenta con expertos de renombre internacional en materia de diagnóstico, tratamiento y profilaxis del cólera dispuestos a acudir con la máxima rapidez en ayuda de todo país que solicite asistencia.

#### *Planes a largo plazo*

Es indispensable que todos los países afectados o amenazados por el cólera establezcan planes a largo plazo (recurriendo, si es necesario, a la asistencia bilateral o

multilateral) para mejorar sus condiciones de saneamiento o su abastecimiento de agua y alejar así el peligro de epidemias. La experiencia ha demostrado que basta con mejorar ligeramente las condiciones de saneamiento y el abastecimiento de agua para que disminuya manifiestamente la transmisión del *V. cholerae*, germen relativamente lábil.

#### Resumen

Según los indicios, "desde 1961 parece estar fraguándose una séptima pandemia de cólera" causada por el biotipo El Tor de *Vibrio cholerae*.

Con el fin de dar cumplimiento al viejo adagio que dice: "más vale prevenir que curar" se ha publicado este suplemento que ha de servir de prontuario y guía práctica tanto para identificar el vibrión colérico como para dar a conocer su método de invasión y sus características. Se da un bosquejo sobre la forma de proceder en el laboratorio para diagnosticar la enfermedad y luego el método de aislamiento del vibrión en el agua, en aguas residuales, en los alimentos, en los fomites, y en las moscas.

Los autores discuten detalladamente el tratamiento a que debe someterse el enfermo de cólera y acompañan una lista del material indispensable, las precauciones necesarias del personal del hospital, y la atención de adultos y niños, entre otras medidas que deben tomarse. Subrayan de manera especial como medidas preventivas el empleo de la vacuna anticólerica, el saneamiento del medio y la vigilancia constante por parte de las autoridades de salud. □

#### **Cholera control. A concise review and guide to practical measures (Summary)**

According to indications, "since 1961, a seventh pandemic outbreak of cholera, caused by the biotype El Tor of *Vibrio cholerae*, appears to be in the making".

This supplement has been published following the dictates of the old adage, "An ounce of prevention is worth a pound of cure". It is intended to serve as a handbook and practical guide for identifying the choleric vibrio and publicizing its method of attack and characteristics. A brief description is given of labora-

tory procedures for diagnosing the disease and the method for isolating the vibrio in water, in sewage, in food, in fomites and in flies.

The authors discuss in detail the treatment of cholera patients and include a list of indispensable supplies, necessary precautions for hospital personnel and the care of adults and children. The importance of anticholera vaccines, environmental sanitation and constant vigilance by health authorities in preventing the disease is stressed.

### Luta contra a cólera. Breve revisão e guia prática (Resumo)

Conforme os indícios, “desde 1961 parece vir-se forjando uma sétima pandemia de cólera” causada pelo biotipo El Tor de *Vibrio cholerae*.

Visando a cumprir o antigo provérbio “mais vale prevenir do que curar”, publicou-se este suplemento para servir de antecedente e guia prático para identificar o vibrião colérico e para dar a conhecer seu método de invasão e suas características. Fornece-se um projeto sobre a forma de proceder no laboratório para diagnosticar a doença e a seguir o método de isola-

mento do vibrião na água, em águas residuais, nos alimentos, nos fomes e nas moscas.

Os autores tratam minuciosamente sobre o tratamento que deve ser aplicado ao doente de cólera e juntam lista do material indispensável, as precauções necessárias para o pessoal do hospital e o cuidado de adultos e crianças, entre outras medidas que se devem adotar. Salientam especialmente como medidas preventivas o emprêgo da vacina contra a cólera, o saneamento do meio e a constante vigilância de parte das autoridades sanitárias.

### Lutte contre le choléra. Bref résumé et indication des mesures pratiques (Résumé)

D'après les renseignements dont on dispose, “depuis 1961, on prévoit une épidémie de choléra, qui serait la septième” et qui serait causée par le virus du choléra du type El Tor.

Conformément au vieil adage “mieux vaut prévenir que guérir”, nous avons publié ce supplément, qui doit servir de mémoire et de guide pratique aussi bien pour identifier le virus du choléra que pour déterminer son origine et ses caractéristiques. Il indique dans leurs grandes lignes les méthodes à utiliser en laboratoire afin de diagnostiquer la maladie, et ensuite la méthode à appliquer pour isoler le virus dans

l'eau, les eaux résiduelles, les aliments, les objets souillés et les mouches.

Les auteurs discutent en détail du traitement approprié du choléra, recommandent une liste du matériel sanitaire indispensable, et indiquent les précautions à prendre par le personnel des hôpitaux, ainsi que les soins à donner aux adultes et aux enfants, etc. Ils recommandent particulièrement, comme moyen préventif la vaccination anti-cholérique et l'assainissement de l'environnement, et conseillent aux services d'hygiène d'exercer une vigilance constante.

### PESTE EN EL BRASIL

El área de peste endémica en el Brasil abarca aproximadamente, 230,000 km<sup>2</sup> con 205 municipios: estado de Ceará (30), Río Grande do Norte (5), Paraíba (9), Pernambuco (50), Alagoas (21), Bahía (74), Minas Gerais (14) y Río de Janeiro (2). Durante 1969 se confirmaron 293 casos de peste con 34 defunciones, distribuidos como sigue: Ceará, 98 casos con 2 defunciones; Paraíba, 3 casos sin defunciones; Pernambuco, 28 casos con 6 defunciones; Bahía, 99 casos con 18 defunciones, y Minas Gerais, 65 casos con 8 defunciones. La distribución de los casos por edad fue la siguiente: 0 a 9 años, 86; 10 a 19, 71; 20 a 29, 49; 30 a 39, 29; 40 y más, 38; edad ignorada, 20. La enfermedad es eminentemente rural, y el 90.8% de los casos de 1969 ocurrieron en haciendas. Los 27 casos que se dieron en ciudades o pequeños núcleos de población pueden también clasificarse como casos rurales por las características de las mismas.

Las actividades preventivas para el control inmediato de focos activos de peste, en 1969, incluyeron 319,665 desinsectizaciones domiciliarias y el empleo de 3,901,784 dosis de rodenticidas. Está desarrollándose desde 1966, en el Municipio de Exu, Pernambuco, un proyecto de investigaciones sobre ecología de la peste, que cuenta con asistencia técnica de la Oficina Sanitaria Panamericana. Siguen las investigaciones sobre ecología de los roedores existentes en los focos de peste permanentes, estudios sobre bacteriología e inmunología de cepas de *Yersinia pestis* y experimentos sobre la conservación del bacilo de peste en la tierra de galerías artificiales.