

Pasteur y la prevención de la enfermedad infecciosa

RENATO HERRERA*

Después que Isaac Newton publicó su magna obra *Philosophiae Naturalis Principia Mathematica*, sus contemporáneos lo cubrieron de elogios y alabanzas, lo que motivó al autor a responder que sus trabajos sólo habían sido posibles porque había tenido la fortuna de hacer estado sobre los hombros de gigantes de la Ciencia, lo cual le había permitido observar al Universo con bases firmes y en una extensión científica hasta ese momento nunca alcanzada. Newton se refería a Copérnico, Kepler y Galileo. Louis Pasteur es el gigante de las ciencias biológicas y, muy especialmente, de la microbiología y la inmunología, de las cuales se le considera, con toda justicia, su creador. Es sobre sus hombros poderosos y permanentes que miles de científicos se han apoyado, no sólo en los tiempos cercanos a su paso por la vida en que dio las pautas básicas del trabajo microbiológico, sino hasta los tiempos actuales y futuros, en los que su ejemplo, su dedicación a la ciencia, su estricto apego a las normas éticas de trabajo, su desapego por los valores materiales y su entrega en la busca de la verdad, constituyen un ejemplo permanente para generaciones de científicos.

*Profesor del Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad de Concepción.

En este año, en que se cumple un siglo de su fallecimiento, he deseado sumarme, con un modesto aporte, a los homenajes que en todo el mundo se rinden a su memoria. Lo hago, porque desde joven escuché el nombre de Louis Pasteur y porque, más tarde, al llegar a la universidad, comencé a conocer su gran obra y el inmenso beneficio que la humanidad ha recibido de sus descubrimientos. Su espíritu parecía estar presente en un retrato suyo, ubicado en el laboratorio de nuestro antiguo Instituto de Microbiología, en la Universidad de Concepción. Su rostro majestuoso y su mirada serena nos observaba, y yo lo imaginaba dándonos ánimo o diciéndonos que debíamos hacer las cosas cada vez mejor y que debíamos trabajar más, que había mucho, pero mucho por aprender todavía.

No es posible para mí referirme a la monumental obra de Pasteur en su conjunto, pues cada uno de sus aportes merece un profundo análisis y una evaluación justa, en cuanto a su trascendencia y proyecciones. Por esta razón, me he atrevido a recordar sólo dos de sus importantes trabajos, que se refieren, respectivamente, a la inmunización contra el carbunco y a las experiencias que lo llevaron a desarrollar la vacuna antirrábica. Pienso que, para mayor claridad y comprensión de sus trabajos, es necesario seguir una secuencia cronológica de lo que se conocía de estos temas antes de Pasteur. Luego, cuáles fueron sus aportes y, posteriormente, cuáles fueron las proyecciones de sus descubrimientos.

EL PROBLEMA DE LA VACUNACION (PREVENCION) DEL CARBUNCLO

El anthrax o carbunco es una enfermedad infecciosa que en el siglo XIX diezmaba el ganado bovino en Francia, con grandes pérdidas económicas, además de casos de carbunco humano producidos a consecuencia del manejo y trabajo con animales enfermos. El agente causal de esta enfermedad, *Bacillus anthracis*, había sido claramente señalado por Rayer como un agente patógeno en 1850, cuando describió unos cuerpos "filiformes" en la sangre de animales muertos por carbunco. En 1863, Davaine demostró que el carbunco podía ser

transmitido experimentalmente a animales mediante la inoculación subcutánea de sangre obtenida de animales infectados. Fue, sin embargo, Koch quien describió el ciclo de vida de esta bacteria, la importancia de su espora como mecanismo mediante el cual el microorganismo permanece latente en el suelo y el hecho de que la ingestión de estas esporas con el pasto por los animales, originaba dentro del organismo la forma activa del bacilo, produciendo una infección fatal.

LA VACUNA DE PASTEUR CONTRA EL CARBUNCLO

El método de atenuación de la capacidad de microorganismos virulentos para producir infecciones, mediante el artificio de cultivarlos en condiciones especiales, como por ejemplo, a una temperatura anormalmente alta, no se emplea ya en nuestros días. Sin embargo, éste fue el método usado por Pasteur para obtener cultivos del bacilo del carbunco con virulencia atenuada. La preparación y uso de su vacuna y el gran éxito obtenido por la eficacia que demostró entonces, constituye un episodio de un interés e importancia dramática en la historia de la bacteriología. Pero, como en toda la obra de Pasteur, los éxitos alcanzados en sus investigaciones no fueron fruto del azar, ni de un trabajo ligero o de intentos fortuitos, sino la consecuencia de una labor permanente y profunda, de la que su brillante inteligencia sacaba conclusiones claras que podían proyectarse hacia la resolución de nuevos desafíos. Así, anteriormente, Pasteur había logrado modificar o atenuar la virulencia de la bacteria *Pasteurella avicida* (actual *Pasteurella multocida*), causante del cólera en las aves, mediante su mantención por varios días a temperatura ambiente. Al inocular la bacteria ahora atenuada en aves, se inducía inmunidad en ellas, la cual las protegía frente a las cepas virulentas. Pasteur pensó que estos mismos principios se podían aplicar en el caso del carbunco.

Después de numerosos experimentos preliminares efectuados con diversas cepas de bacilos, escogió finalmente una que cultivó a diferentes temperaturas, entre 39°C y 43°C (debe recordarse que 37°C es la temperatura óptima para el desarrollo del bacilo). Pasteur observó que las temperaturas de incubación empleadas producían la pérdida de

algunas de las propiedades normales de la bacteria, entre ellas las que parecían condicionar su virulencia y su capacidad de formar esporas. Finalmente, Pasteur logró establecer que la temperatura más adecuada para incubar los cultivos y obtener estos efectos era de 42°C. De esta manera, el agente inmunizante finalmente logrado por Pasteur consistía en cultivos bacterianos vivos, obtenidos en un medio líquido a partir de las cepas atenuadas por la incubación a la temperatura determinada previamente. Después de varios ensayos de inmunización en el laboratorio, Pasteur comunicó que efectuaría una experiencia pública para demostrar la eficacia de su vacuna contra el carbunco. Para Pasteur, esta decisión fue muy dura y motivo de gran preocupación y angustia, porque sus ideas y sus investigaciones habían sido duramente criticadas y en algunas ocasiones rechazadas de plano. Por ello, un posible fracaso constituiría un golpe del que difícilmente podría recuperarse. Sin embargo, su carácter indómito y la firme creencia de que estaba en lo cierto, le dio la confianza para hacer esta experiencia. En ese escenario dramático se realizó una de las experiencias científicas que han marcado un hito en la historia de la microbiología y la medicina. Así, el día 5 de mayo de 1881, en la pequeña localidad de Pouilly le Fort, cercana a París, Pasteur vacunaba, con una primera dosis, a 24 ovejas, 1 cabra y 6 vacas con sus cultivos del bacilo del carbunco atenuado. El 17 de mayo les inoculó una segunda dosis y luego, cuando consideró que los animales habían desarrollado inmunidad, precisamente el 31 de mayo, procedió a inocular a todos los animales previamente vacunados y a un grupo de animales no vacunados que servirían de control, con un cultivo de bacilo del carbunco plenamente virulento. Cuando Pasteur arribó a Pouilly le Fort dos días más tarde para constatar los resultados, fue recibido con grandes aplausos y felicitaciones por un público abigarrado y expectante que se había congregado en el lugar de la experiencia. No era para menos, pues todos los animales inoculados, excepto uno, habían sobrevivido. Por el contrario, en el grupo de los animales no vacunados, todos habían fallecido por la mortal enfermedad.

Todavía hoy día los estudiosos se admiran del éxito obtenido por Pasteur en esta ocasión, ya que prácticamente logró proteger al 100 % de los animales vacunados, resultado que nunca más fue posible obtener

nuevamente mediante el uso de la vacuna de Pasteur. ¿Qué pudo haber sucedido, para que todo se conjugará para obtener tan brillante éxito? Ni remotamente, y en mi concepto sería una inmensa herejía, pensar siquiera en un fraude, conociendo la estricta disciplina científica de Pasteur, su ética superior y su valor moral. Además, ésta fue una experiencia pública, observada y sometida al juicio de profanos y entendidos. ¿Qué fue lo que realmente sucedió en ese histórico momento? ¿De qué manera los cultivos atenuados lograron mantener toda su capacidad para producir inmunidad, aún después de haber sido sometidos a temperaturas tan alejadas de aquella óptima para su crecimiento? Hoy día sabemos que los responsables de la virulencia del bacilo del carbunco y de la inducción de inmunidad son varios elementos, algunos estructurales como su cápsula, como así también otras sustancias liberado en los tejidos infectados, entre ellos, el factor productor de edema, un antígeno protector y otro factor con propiedades letales. Ya en 1884, el sabio ruso Metehnikol, descubridor de la inmunidad celular, trabajando en el laboratorio de Pasteur con cepas de *B. anthracis*, tanto virulentas como atenuadas, describió la incapacidad de los leucocitos de conejo y cobayo para ingerir "fagocitar" y destruir bacilos capsulados. En cambio, las cepas atenuadas de Pasteur usadas en la vacuna eran rápidamente fagocitadas por estas células defensivas. Por lo tanto, los cultivos atenuados debían haber mantenido intacta su capacidad para producir sustancias inmunizantes (el factor productor de edema, el antígeno protector y el factor letal), y esto nadie pudo lograrlo después de Pasteur. Su éxito llegó justo en el momento más necesario de la vida de Pasteur y sus proyecciones aún nos alcanzan hoy día. Son muchos los que piensan, y así lo han escrito, que la Providencia le dio una ayuda a Pasteur, desde luego muy merecida.

EL PROBLEMA DE LA HIDROFOBIA O RABIA

A mediados del siglo pasado, la rabia tenía carácter epizootico en la mayoría de los países europeos. En 1865, por ejemplo en Londres, ocurrieron 19 casos fatales de rabia en humanos y en 1866 esta enfermedad se encontraba muy difundida en Inglaterra. En 1869 aparece

la rabia en París y poco años antes, en 1865. Trousseau había publicado su clásica descripción clínica de la rabia, siendo de opinión de que un "virus" específico era la causa de la enfermedad, la cual se transmitía solamente por la mordedura de un animal rabioso. A la autopsia de los fallecidos, y empleando los métodos de la época, no encontraron lesiones anatómicas específicas. Como tratamiento, recomendaba la cauterización con fierros calentados intensamente. Además, Trousseau fue el primero en recomendar el uso de curare para relajar a los enfermos. En Rusia, donde la rabia siempre fue un gran problema por la gran abundancia de lobos, se presentó entre 1860 y 1872 un gran aumento de los casos de rabia y en esos doce años, 2724 personas fueron mordidas por animales rabiosos con una mortalidad de 47 personas sólo en San Petersburgo.

En 1854, Bouchard, discutiendo acerca del valor terapéutico de diversos procedimientos aplicados a individuos mordidos por animales rabiosos, pensó, por primera vez, en la posibilidad de inoculación (¿vacunación?) contra la rabia. Bouchard realizó en base a esta idea una serie de experimentos en la Facultad de Veterinaria de Lyon. Pasteur tuvo conocimiento de sus trabajos y probablemente éstos influyeron tempranamente en su personal idea de llegar a preparar una vacuna antirrábica. En este ambiente le tocó actuar a Pasteur, publicando su primer trabajo sobre la rabia durante 1881, época en que numerosos investigadores estaban intentando transmitir la rabia del hombre a los animales y de un animal a otro. El primer experimento de Pasteur, efectuado empleando saliva de un niño muerto de rabia, produjo una septicemia por neumococo en el conejo inoculado, lo que fue reconocido por él como un efecto colateral y de ningún modo relacionado con el agente causal de la rabia. Por el contrario, otros investigadores, al obtener resultados similares, pensaron que habían reproducido la rabia, aunque los conejos habían fallecido ya a las 48 horas. Pasteur, con su extraordinaria perspicacia y habilidad experimental, en su comunicación a la Sociedad Científica de París resolvía el problema dando la explicación exacta: la saliva del niño, además del probable agente causal de la rabia, contenía neumococos virulentos que, en definitiva, mataban al conejo. Más adelante, a medida que avanzaba en sus investigaciones,

pudo decir "que el sistema nervioso central y especialmente el bulbo que une la médula espinal al cerebro, están particularmente relacionados y activos en el desarrollo de la enfermedad". Informaba además que había reproducido la rabia mediante la inoculación de material del sistema nervioso central y de líquido espinal. Por lo tanto, concluía que el asiento del virus no era sólo la saliva sino principalmente el tejido nervioso. A Pasteur le preocupaban las dificultades experimentales y el extenso período de incubación que seguía a la inoculación clásica del material infeccioso. Pero, rápidamente descubrió que al inocular materia cerebral de animales rabiosos directamente en el cerebro de perros, el período de incubación se acortaba a una, dos, o a lo más, a 3 semanas. Más adelante hizo nuevos hallazgos. Así por ejemplo estableció que la saliva no era una fuente satisfactoria de virus para el trabajo experimental, ya que sus efectos eran inciertos y el período de incubación podía ser muy largo. Además, nuevamente se refirió a la certidumbre y rapidez con la que podía producirse la rabia mediante la inoculación intracerebral directa de material proveniente del sistema nervioso central de animales rabiosos. Puntualizó que el virus no sólo se encontraba en los centros inferiores del cerebro, sino también en la médula espinal. Diferenció la llamada rabia muda, caracterizada por parálisis, de la llamada rabia furiosa, en la que el animal indiscriminadamente muerde cualquiera cosa, viva o inanimada. Pasteur encontró además que la inoculación del material infeccioso directamente en el torrente sanguíneo afectaba primero la médula espinal, con mayor probabilidad de producir el tipo de rabia muda que la furiosa. También constató que los animales que se recuperaban después de los primeros síntomas de rabia, quedaban inmunes frente a una reinoculación. Además, ciertos perros parecían tener una resistencia natural a la rabia. Finalmente, en esta serie de estudios reprodujo la rabia mediante la inoculación intracerebral de todas y cada una de las partes del cerebro de una vaca muerta de rabia.

El año 1884, un año de muchos casos de rabia en Francia, Pasteur publicó nuevos y más definitivos resultados de su intenso trabajo. En ellos volvía a recalcar que las inoculaciones endovenosas generalmente producían rabia de tipo paralítica y que la médula espinal de los perros sacrificados al primer síntoma de parálisis demostraba la

presencia de virus cuando aún no había evidencia de virus en el bulbo. También demostró la presencia de virus en el nervio neumogástrico y en las glándulas salivales, concluyendo que todo el sistema nervioso era susceptible al virus y que éste mantenía su virulencia en médula espinal mantenida entre 0°C y 12°C. Aún cuando Pasteur fue incapaz de cultivar bacterias del sistema nervioso de animales con rabia, acotó que "uno está tentado a creer que un microbio de infinita pequeñez, teniendo una forma que no es de bacilo ni de micrococo es la causa de la rabia". En esto, Pasteur también estaba en lo cierto, pues su intuición, cercana a la clarividencia, adelantó magistralmente la forma del virus de la rabia. Efectivamente, el virus es muchísimo más pequeño que cualquiera bacteria, mide entre 70 a 80 nm de ancho, por 130 a 230 nm de largo y tiene la forma de un proyectil.

DESARROLLO DE LA VACUNA ANTIRRABICA

A fines de 1884, Pasteur, en colaboración con Chamberland y Roux, presentó otro informe a la Academia de Ciencias, esta vez relacionado con la atenuación del virus, lo que se logró por traspaso del virus rábico del perro al mono y luego del mono a otros monos. Se constató así que la virulencia decaía, disminuyendo entre pasaje y pasaje. Si el virus era retornado a un perro, conejo o cobayo, permanecía atenuado y no recuperaba inmediatamente la virulencia del virus de la calle. Aún, inoculaciones intracerebrales podían no producir la enfermedad, aunque sin embargo se establecía un estado refractario frente a la enfermedad. Mediante la aplicación de series de inoculaciones con virus atenuados, Pasteur logró que perros se hicieran inmunes o, al menos, refractarios a la rabia. En este informe, por primera vez en forma general, postuló la posibilidad de inmunización del hombre con virus atenuado y, sobre todo, sacando ventaja del largo período de incubación de la rabia.

En 1885 remitió a la Academia, en forma más detallada, una metódica más objetiva de inmunización que consistía en la inoculación del virus silvestre o de la calle intracerebralmente en conejos, efectuando posteriormente pasajes seriados en forma secuencial. Después de

90 pasajes, el período de incubación gradualmente se acortaba hasta alcanzar un período fijo de 7 días. La médula espinal de estos conejos contenía virus en toda su extensión. Las médulas eran removidas y colocadas en aire seco a temperatura ambiente. Pasteur observó que la virulencia de la suspensión de médula decrecía rápidamente a medida que aumentan los días de desecación, propiedad que se perdía totalmente a los 15 días de tratamiento. El proceso de inmunización se realizaba en perros mediante inoculaciones subcutáneas de un medio líquido que contenía una pequeñísima porción de médula espinal de conejo, comenzando con una muestra desecada lo suficiente como para ser avirulenta y usando sucesivamente material cada vez más virulento, hasta terminar con la inoculación de porciones de médula sin desecación conteniendo virus plenamente virulento. A este nivel, el perro era ya refractario a la rabia, como fue demostrado en 50 animales vacunados.

Justamente, cuando Pasteur se encontraba finalizando sus experiencias con perros, llegó a París desde Alsacia un niño de 9 años, Joseph Meister, que había sido mordido 14 veces por un perro rabioso. Los célebres doctores Vulpian y Grancher examinaron al niño y su diagnóstico fue de que éste estaba condenado a muerte, pues había recibido dosis fatales de virus rábico. El paciente fue llevado a Pasteur quién expresó: "la muerte de este niño parece inevitable y he decidido, no sin profundas y crueles dudas, hasta donde es posible, probar en Joseph Meister el método que ha sido eficaz en perros". Así, la historia recuerda que "el 6 de julio, a las 8 horas en la tarde, y después de 60 horas transcurridas desde la mordedura, en presencia de los doctores Vulpian y Grancher, el pequeño Meister fue inoculado en el hipocondrio derecho bajo el pliegue de la piel con media jeringa conteniendo médula espinal de conejo rábico mantenida 15 días en un recipiente de aire seco". Se le practicaron 13 inoculaciones sucesivas con médulas de virulencia creciente. El maravilloso resultado fue que el niño nunca desarrolló la rabia, de tal modo que las bases de un método eficaz para prevenir la terrible enfermedad se habían establecido sólidamente.

Después del último informe de Pasteur a la Academia de Ciencias, como era de esperar, prosiguió un interesante debate en el que el doctor Vulpian manifestó: "La rabia, esa terrible enfermedad contra

la cual todos los intentos terapéuticos hasta ahora han fallado, ha encontrado finalmente su remedio". Un año más tarde, en 1886, Pasteur comunicó los resultados del tratamiento de 350 casos, con el fallecimiento de sólo una persona, un niño mordido el 3 de octubre de ese año y que no fue llevado para aplicarle el tratamiento sino hasta el 9 de noviembre. Había transcurrido casi un mes desde la penetración del virus y ya no era posible que la vacuna pudiera crear la inmunidad necesaria. Si se revisan las estadísticas de la época, la mitad de las personas mordidas desarrollaban rabia. Por lo tanto, los resultados obtenidos por Pasteur eran impresionantes. El ilustre sabio, pensando en beneficiar al mayor número posible de pacientes, postuló: "Se ha establecido la profilaxis de la rabia y es el tiempo de crear un centro para la vacunación contra la rabia". Frente a esto, la Academia de Ciencias designó una comisión especial para hacer realidad la proposición de Pasteur. Dicha comisión informó que debe crearse un establecimiento, a llamarse Instituto Pasteur, para el tratamiento de ciudadanos franceses y de otras nacionalidades. En el lapso de una década se habían creado Institutos Pasteur alrededor del mundo en los que, empleando inicialmente las técnicas del gran sabio y posteriores modificaciones en la preparación de la vacuna, se han librado a miles de seres humanos de morir de una enfermedad cuya sintomatología final es terrible y dramática.

Actualmente existen 23 centros que llevan el nombre de Louis Pasteur, y que se encuentran distribuidos en todo el mundo, constituyendo la red pasteuriana que contribuye eficazmente a mejorar las condiciones de salud y la investigación científica, especialmente en países del tercer mundo. Fue el mismo Pasteur el que inició esta cruzada de colaboración internacional cuando, en 1891, envió a A. Calmette a Saigón para crear un laboratorio que se dedicara a la preparación de vacunas contra la rabia y la viruela. Siguiéron otras misiones encargadas a sus principales colaboradores. Así, Thuillier partió a Egipto a estudiar el cólera, Loir fue a Australia y Rusia con el encargo de crear institutos destinados a la lucha antirrábica, otros fueron a Dalat, Túnez, Algeria y Río de Janeiro con este mismo objetivo.

Hoy día, el Instituto Pasteur de París goza de un prestigio internacional como centro de excelencia en la investigación, enseñanza y producción de reactivos biológicos de alta calidad. En sus aulas y laboratorios se han formado científicos que le han dado extraordinaria fama a Francia, comenzando con los colaboradores y discípulos de Pasteur, entre ellos, Roux, Chamberland, Calmette, Yersin y Thuillier. Luego, de este centro han salido maestros contemporáneos como F. Jacob, A. Lwoff y J. Monod, que han obtenido el Premio Nobel en Medicina y, por último en nuestros días, a Luc Montagnier y sus colaboradores, que descubrieron el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Todos estos investigadores son depositarios del espíritu de Pasteur, de sus enseñanzas y de su rigor científico, que él mismo resumió en su frase "N'avancez rien que vous ne puissiez prouver par l' experimentation" .



Fig.1. Vacunación de ovinos contra la enfermedad del carbunco, en Pouilly-le-Fort (1881).



Fig.2. Frasco conteniendo la médula espinal de un animal rabioso (1885).

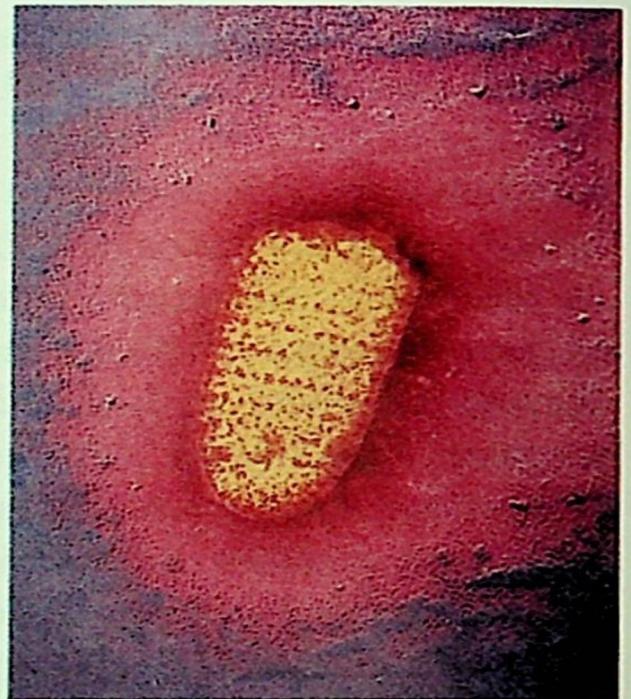


Fig.3. Virus de la rabia (microscopía electrónica de transmisión).