

Infecciones a *Pseudomona Aeruginosa* {B Píocianico} en el lactante

Por OBDULIO MUÑOZ BOLÍVAR (*)

I.—GENERALIDADES

El amplio uso de los antibióticos en la práctica médica, ha creado problemas microbiológicos. Entre los que debemos señalar:

1. Frecuencia con que se presentan los distintos gérmenes en las enfermedades bacterianas del lactante.
2. Aparición de microorganismos resistentes a los antibióticos.
3. Transformación del balance ecológico de la flora normal.
4. El desarrollo de la disbacteriosis y de la superinfección.
5. Depresión de la inmunogenénesis y otras cuestiones.

Gérmenes que hace años eran considerados como saprófitos inofensivos, en la actualidad son los más agresivos y frecuentes. De acuerdo con las últimas estadísticas vemos como las sepsis por *Esch. coli*, *B. proteus*, *Klebsiella* y enterococo se han incrementado alcanzando una frecuencia de hasta un 70%. Las infecciones generalizadas a bacilo piocianico, en otro tiempo casi inexistentes, han sufrido un aumento en frecuencia, adquiriendo un tremendo poder patógeno en determinadas circunstancias, ocasionando en el lactante for-

mas septicémicas graves, meningitis y neumopatías que van elevándose en estos últimos años.

De acuerdo con la mayoría de los autores, esto se debe al amplio uso de los antibióticos, los que al actuar con gran efectividad sobre las especies bacterianas presentes en el organismo y la flora patológica más usual, favorece la implantación y desarrollo de otros microorganismos entre ellos los del género *Pseudomonas*, el cual incrementa su papel patógeno cuando se encuentra aislado.

II.—PATOGENICIDAD DEL BACILO PÍOCIANICO

La patogenicidad facultativa de este germen, fue señalada en 1907 por *Karsen* y colaboradores, experimentalmente se ha reproducido en el conejo los mismos cuadros que la clínica atribuye a este germen. Por vía venosa da lugar a un cuadro séptico mortal, por vía subcutánea origina escaras y cuando se administra por vía digestiva, desencadena procesos diarreicos, los que también se logran administrando filtrados de bacilos. Se ha reportado en brote de gastroenteritis aguda y en los casos mortales ha sido aislado el bacilo piocianico de los órganos. En algunos pacientes se ha aislado del exudado pericardíaco y del pus de los abscesos hepáticos. *Wasserman* lo aisló en una serie de infecciones del cordón umbilical. *Jawetz* lo re-

(*) Del Laboratorio Regional de Oriente Norte, Holguín, Oriente, Cuba.

porta en varios casos de septicemia y según Pons, en los trópicos, es responsable de infecciones semejantes a la tifoidea. Origina también anginas pseudo-membranosas, que pueden confundirse con la difteria, ectima gangrenosa y lesiones necróticas o ulcerosas de la mucosa digestiva.

En nuestro medio ha sido señalado por Curbelo en brotes de gastroenteritis y asociado con bacteriófago en un caso de peritonitis que evolucionó favorablemente. Nosotros los hallamos con frecuencia en pacientes con gastroenteritis, otitis, osteomielitis y cistitis. La evolución de los procesos sépticos debidos al bacilo piocianico suelen ser rápidamente fatales, en las formas localizadas evolucionan hacia la cronicidad.

III.—SUPERINFECCIONES

Ultimamente han adquirido gran importancia las superinfecciones debidas a *Pseudomonas*, las cuales suelen presentarse bajo la forma de septicemia, otitis, meningitis, pielonefritis, que se desarrollan durante y después de la administración de antibióticos que actúan contra la *Esch. coli* y otros microorganismos Gram-negativos del contenido intestinal.

El desarrollo de este tipo de superinfecciones, es realmente la consecuencia de una "autoinfección" provocada por bacterias que forman parte de la flora "normal" del organismo, las cuales son resistentes a los antibióticos utilizados durante el tratamiento.

Además de este tipo de superinfección endógena, se han reportado superinfecciones intrahospitalarias en pacientes sometidos a intensa terapia con antibióticos, en establecimientos hospitalarios donde no se observan a cabalidad las exigencias sanitarias. Para reconocer el carácter de estas complicaciones, es necesario estudiar detenidamente al pa-

ciente, con el fin de identificar el nuevo agente de la infección con el habitante dominante en la microflora "normal" del enfermo (superinfecciones auténticas) o con las especies o cepas bacterianas que se aislen al mismo tiempo al personal médico o sanitario o de otros enfermos de la misma sala o del mismo Hospital (superinfecciones intrahospitalarias).

IV.—CARACTERES DEL MICROORGANISMO

El germen suele ser un contaminante que puede causar ciertos trastornos al bacteriólogo, debido a su persistencia en crecer en los más variados medios de cultivos, lo cual puede obviarse en parte mediante la adición de telurito o potasio o de cloruro de litio a los mismos.

Se trata de un bacilo que mide 1.5 a 3 micras de largo por 0.3 micras de ancho, recto, de extremos redondeados y lados paralelos. Es móvil y gran negativo. Presenta de 1 a 3 flagelos en uno de sus polos y no forma esporos. Es aerobio y crece con facilidad en todos los medios de cultivo.

V.—PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS

Cuando el microorganismo aparece como causante de una infección piógena, el pus adquiere una tonalidad "verde azulado", la cual se transmite fácilmente a la ropa y apósitos con que se cubre la herida. Esto se debe a la presencia de los dos pigmentos principales que produce el germen:

- a) La piocianina, de color azul verdoso.
- b) La fluoresceína de color amarillo verdoso y fluorescente.

La piocianina es soluble en cloroformo y en agua, la fluoresceína sólo es soluble en agua. En cultivos viejos toman un color moreno.

Además de los pigmentos mencionados, se describe la pioxantosa, la cual es un producto de descomposición de la fluoresceína. La piorrubina (pigmento rojo) es producida por algunas cepas eritrogénicas.

Gessard designa los bacilos piociánicos con letras para indicar su función cromógena o la falta de ella. El tipo normal, que elabora todos los pigmentos los señala con la letra A; el que sólo produce piocianina, con la inicial P; el que únicamente forma fluoresceína con la letra F; y el que ha perdido su función cromógena con la letra S.

VI.—PRODUCCIÓN DE ENZIMAS

La *Pseudomona* desarrolla fermento Lab. que coagula la leche, una enzima proteolítica llamada piocianasa que tiene la propiedad de disolver las bacterias, particularmente los bacilos diftérico y fermentos lipolíticos que actúan sobre la grasa.

Toxinas: El bacilo piociánico produce endotoxina y toxina soluble, que resiste 100°C por corto tiempo.

Hemolisina y leucocidina: El microorganismo da lugar a una hemolisina con la cual se prepara antihemolisina, la leucocidina fue descrita por Gheorghiewski.

VII.—COMPOSICIÓN ANTIGENICA

Se trata de un grupo de gérmenes antigénicamente heterogéneos. Existe aglutinación recíproca entre el bacilo piociánico y el proteus, de modo que el suero preparado con uno de estos cultivos aglutina el otro y viceversa. Wilson ha descubierto que el suero de los enfermos de tifus, aglutinan a ciertas cepas de bacilo piociánico a semejanza de lo que ocurre con *Proteus* O $\times$ 19.

VIII.—INOCULACIONES EXPERIMENTALES

En el conejo, por vía venosa, desarrolla una enfermedad aguda acompañada de fiebre, diarrea y albuminuria, que mata al animal en 24 ó 48 horas.

Si el cultivo es poco virulento o la dosis insuficiente, la infección es crónica, siendo sus síntomas parálisis y contractura de los miembros. En la necropsia se encuentran lesiones del corazón y de los riñones.

Haciendo inoculaciones en serie se logra exaltar la virulencia a tal grado que el cultivo en caldo, que mataba a la dosis de 1 cc. lo hará en cantidades de un décimo o una centésima de cc.

El curiel inyectado por vía intraperitoneal, muere de peritonitis aguda con paso de los gérmenes a la sangre.

IX.—DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El diagnóstico bacteriológico, se basa en el aislamiento del bacilo, del pus, de las heces diarreicas, en exudado faríngeo, en la sangre, en la orina, etc. En los casos de septicemia es necesario obtener una positividad repetida para descartar simples crisis bacterihémicas.

La serología es inconstante, suele ser negativa con gran frecuencia, valores superiores a 1×40 suelen considerarse de valor diagnóstico.

X.—HALLAZGOS CLÍNICOS

El objeto del presente trabajo, es reportar la presencia del bacilo piociánico, en la sangre, lesiones cutáneas y piezas de necropsia de un grupo de niños menores de 6 meses, ingresados por gastroenteritis en el Hospital Pediátrico de Holguín y Mártires de Victoria de las Tunas, a los cuales se habían sometido con anterioridad a su ingreso y durante el mismo a intenso tratamiento por antibióticos. La mayoría de ellos

evolucionaron hacia la muerte, aislándose posteriormente de las lesiones de los órganos internos (hígado y pulmones) el germen causal de la infección. Hemos catalogado estos casos como de "superinfecciones" provocadas por el uso de antibióticos; teniendo en cuenta que la mayor parte de los pacientes presentan historia de haber sido hospitalizados en varias ocasiones por gastroenteritis y haber sido sometidos durante ese tiempo a tratamientos prolongados con antibióticos de amplio espectro y con quimioterápicos. Otro grupo de enfermos ingresaban por primera vez en el servicio, pero habían tenido una estadía que en ocasiones llegó hasta dos meses, recibiendo la misma terapéutica de los casos anteriores. Podemos señalar que los casos fallecidos hicieron el cuadro terminal de las sepsis a bacilo piocianico con las manifestaciones clásicamente descritas, primero por Ehlers en 1890 con el nombre de *Ectima terebrante* y más tarde por Hirtshmann-Kreibich como *ectima gangrenosa*. En casos a los cuales se aisló piocianico en flictenas pero que curaron, quedaron las cicatrices deprimidas, también descrita por estos autores. En la necropsia realizada a los casos fallecidos se encontró sin excepción focos piógenos en pulmones y en hígado, aislándose de estas lesiones las *Pseudomona Aeruginosa* en cultivo puro.

XI.—MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos estudiado un grupo de 56 pacientes cuya edad oscila entre 1 y 6 meses, en los cuales hemos aislado 82 cepas de *Pseudomona aeruginosa* (bacilo piocianico), de las cuales 40 proceden de hemocultivos, 28 de lesiones de la piel (flictenas), 12 de pulmón y 2 de hígado, obtenida estas últimas en las piezas de necropsia. Las colonias fueron clasificadas primeramente, atendiendo a

sus caracteres morfológicos, producción de pigmento y el característico olor a trimetilamina. Una clasificación ulterior fue practicada atendiendo a los caracteres culturales, bioquímicos y biológicos del microorganismo.

XII

Cada cepa fue estudiada para comprobar sus caracteres culturales y bioquímicos, utilizando los siguientes medios y reactivos:

1. Agar sangre al 5%.
2. Agar nutritivo.
3. BHI.
4. Medio de Kligler.
5. Mac Conkey.
6. Gelatina.
7. Medio de PAL.
8. Simons Citrato.
9. Urea.
10. Indol.
11. KCN.
12. Malonato.
13. Glucosa.
14. Lactosa.
15. Sacarosa.
16. Prueba de coagulosa.

XIII.—CARACTERES CULTURALES DE LOS MICRO-ORGANISMOS AISLADOS

1. *En agar sangre*: Colonias grandes translúcidas, mucoides, con pigmentación amarilloverdoso. Intensa hemólisis en los medios preparados con sangre de carnero y con sangre humana respectivamente.
2. *En agar nutritivo*: Colonias grandes, irregulares, translúcidas, extensas, grises con un centro oscuro y de borde circular u ondulado. El pigmento azulverdoso se difunde en el medio de cultivo, soluble en agua. Todas las ce-

pas estudiadas por nosotros fueron productoras de pigmento.

3. *En medio de BHI*: Crecimiento abundante, formando una gruesa película, turbidez intensa y sedimento espeso. El medio toma color verdoso el cual cambia hacia color marrón a medida que el cultivo envejece.
4. *En medio Kligler*: En este medio hemos observado dos tipos de lectura:
 - a) La lectura clásica en el cual todo el medio aparece rojo y no haber fermentación de la glucosa ni lactosa.
 - b) Cepas que acidifican la glucosa y producen SH₂.

En ambos casos se aprecia el brillo metálico, la típica tonalidad carmelita oscuro de la estría y el característico olor a trimetilamina.

5. *En Mac Conkey*: Colonias grandes, planas, irregulares, presentando el centro de un color carmelita.
6. *En gelatina*: Desarrollo filiforme de la siembra profunda. Licuefacción en 18-24 horas. El aspecto del medio se torna amarillo-verdoso. La licuefacción se debe a la acción de un fermento proteolítico denominado proteasa.
7. *En medio de PAI*: Crecimiento abundante, digestión del medio en 18-24 horas formación de pigmento verde azulado.
8. *En Simons citrato*: Todas las cepas estudiadas utilizan el citrato como única fuente de nitrógeno.

9. *Producción de urea e Indol*: No hubo hidrólisis de la urea ni producción de Indol por ninguna de las cepas estudiadas.
10. *En malonato*: Crecimiento con cambio de coloración del medio.
11. *K C N*: Abundante crecimiento con formación de sedimento.
12. *Producción SH₂*: Dos de las cepas estudiadas produjeron SH₂ en el medio de Kligler.
13. *Producción de pigmentos*: En todas las cepas examinadas se comprobó la producción de pirocianina, soluble en cloroformo y en agua.
14. *Hidrólisis de glucosa, lactosa y sacarosa*: No se demostró la formación de ácido ni gas en los medios con lactosa ni sacarosa. Algunas de las cepas estudiadas acidificaron ligeramente la glucosa.
15. *Prueba de coagulosa*: La prueba de coagulosa resultó positiva en el 80% de los cultivos.

XIV.—INOCULACION EXPERIMENTAL EN RATONES

Se inyectaron ratones con un peso de 22 y 25 gramos, por vía intraperitoneal con una dosis de 0.1 ml, de un cultivo de *Pseudomona Aureoginosa* en medio de BHI incubado a 37°C durante 18-24 horas.

Desde la primera hora de la inyección los animales presentaron síntomas de alteración física, tales como erizamiento del pelo, intranquilidad, y en la fase final agotamiento que los llevó a la muerte en un período de tiempo que osciló entre 4-5 horas. En la autopsia se demostró intensa reacción peritoneal con presencia de líquido y síntomas de congestión pulmonar. El germen fue reaislado

de: pulmones, riñones, corazón y líquido peritoneal.

Los animales de control inyectados con 0.2 ml de solución salina no presentaron alteración alguna durante el tiempo de observación.

XV.—SEROLOGÍA

En las pruebas serológicas, practicadas utilizando antígenos preparados según el método de Biens con los propios gérmenes aislados en cada paciente, se encontraron títulos de aglutininas que oscilaron entre 1×10 y 1×320 .

XVI.—SENSIBILIDAD Y RESISTENCIA A LOS ANTIBIÓTICOS

Las pruebas de sensibilidad a los antibióticos fueron practicada utilizando el método de los discos en placas de agar, los cuales son suministrados por el INHEM, utilizándose los siguientes:

1. Cloromicetina.
2. Eritromicina.
3. Polimixina B.
4. Novobiocina.
5. Estreptomycin.
6. Terramicina.

De las 82 cepas probadas, solamente 32 fueron sensibles al Polimixin B, el resto (50 cepas) no presentaron sensibilidad en esta prueba. Catorce de las 82 cepas a la Terramicina y doce al Cloranfenicol.

Las 50 cepas no sensibles al Polimixin B, por la prueba de discos rutinariamente practicadas en este Laboratorio, fueron probadas utilizando la prueba de dilución en tubos, frente al Polimixin B, encontrándose con los siguientes resultados: 28 fueron sensibles a una dosis de 25 microgramos por ML. *in vitro* y las restantes a 50 microgramos por NL.

Cifras éstas muy elevadas y difíciles de conseguir en sangre o tejidos. La resistencia fue de 50 y 100 microgramos respectivamente. Lo cual explica la reacción negativa que se obtiene con la prueba de discos.

XVII.—SUMARIO Y CONCLUSIONES

Se hace un estudio bacteriológico de 56 niños, cuyas edades oscilan entre 1 y 6 meses, ingresados en los Hospitales Pediátrico de Holguín y Mártires de Victoria de las Tunas, por gastroenteritis, los cuales desarrollaron *superinfecciones a bacilo piocianico*, evolucionando fatalmente gran número de ellos.

Los pacientes fueron sometidos previamente a su ingreso o durante el mismo a intenso tratamiento por antibióticos de amplio espectro y por quimioterápicos; otros tuvieron una larga estadía hospitalaria, recibiendo igualmente grandes dosis de antibióticos.

El agente causal de las superinfecciones fue aislado en todos los casos estudiados por hemocultivo. Igualmente se obtuvieron cultivos puros del germen de las lesiones y flictenas de la piel, las cuales estuvieron presentes en algunos de los pacientes. En los casos en que fue practicada la necropsia, se lograron cultivos positivos del germen causal, en las lesiones de pulmones y de hígado examinados.

Las cepas aisladas, 82 en total, fueron comprobadas bacteriológicamente demostrándose en dos de ellas la producción de SH2. Los caracteres culturales y bioquímicos de los gérmenes aislados, nos permiten clasificarlos como especies del género *Pseudomonas* (*Pseudomonas Aeruginosa*).

Las pruebas serológicas, aunque de escaso valor en estos casos, arrojaron títulos de anticuerpos, cuyos valores oscilaron entre diluciones al 1×10 hasta 1×320 .

Las pruebas frente a los antibióticos, demuestran la gran resistencia de esta especie de gérmenes, frente a los antibióticos de uso frecuente tales como son: Cloromicetina, Terramicina, Estreptomycin, Novobiocina, Eritromicina, etc., incluyendo al Polimixin-B, antibiótico, este último altamente selectivo para el tratamiento de los procesos infecciosos debidos al bacilo pio-ciánico y al cual como hemos podido comprobar, sólo 32 de las 82 cepas estudiadas mostraron sensibilidad en las pruebas de discos de antibióticos, corrientemente empleadas en nuestros Laboratorios. El resto de las cepas probadas, arrojaron cifras de sensibilidad altamente elevadas, cuyos valores son difíciles de alcanzar en sangre y menos aún en los tejidos corporales.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

A bacteriological study has been made of 56 children with ages ranging from 1 to 6 months admitted for gastroenteritis at the Children's Hospital of Holguín and the "Mártires" Children's Hospital of Victoria de las Tunas who developed "Bacillus Phycocyaneus super infections" with fatal outcome in many.

These patients had been given intensive broad-spectrum antibiotics therapy and chemotherapy either before or after having been admitted at the hospital; some had a long hospital stay, also receiving high doses of antibiotics.

The causal agent of these superinfections was isolated in all those cases where hemoculture studies were performed. Pure cultures of the above-mentioned germ were obtained from lesions and phlyctaens of the skin present in some of our patients. In those cases where a necropsy was performed positive cultures of the causal germ were obtained from pulmonary and hepatic lesions studied.

The isolated strains, 82 in total, were verified bacteriologically, SH_2 production having been demonstrated in two. Cultural and biochemical features of the isolated germs allow us to classify them as belonging to species of the genus *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*).

Serological tests, although of little value in these cases, gave antibody titers ranging from 1:10 to 1:320 dilutions.

Tests against antibiotics have shown the strong resistance of this species of germs against antibiotics frequently used such as chloromycetin, terramycin, erythromycin, etc. including polymyxin B, the latter a highly selective antibiotic for the treatment of infections caused by the *Pseudomonas pyocyaneus* bacillus: As to latter we have found only 32 out of the 82 studied strains showed to be sensitive to it when tested on antibiotics test disks routinely used at our laboratories. The other strains tested gave such high sensitivities and are difficult to be found in blood and still more in body tissues.

RESUME ET CONCLUSIONS

On y fait une étude bactériologique de 56 enfants âgés de 1 à 6 mois, admis à l'Hôpital de l'Enfance d'Holguín et à l'Hôpital de l'Enfance "Mártires" de Victoria de las Tunas pour être atteints de gastroentérite et chez lesquels il s'est présenté des surinfections au bacilles pyocyaniques dont un grand nombre a suivi une évolution fatale.

Malades ont été soumis à un traitement intensif avec des antibiotiques d'ample spectre et la chimiothérapie lors de leur entrée à l'hôpital ou après: certain d'entre eux ont en un séjour prolongé à l'hôpital recevant eux aussi de grandes doses d'antibiotiques. L'agent causant des surinfections a été isolé chez tous les cas qui ont été étudiés au moyen de l'hémoculture.

On a aussi obtenu des cultures pures de ce germe des lésions et des phlyctènes cutanées que présentaient quelques-uns de malades. Chez les cas où l'on a réalisé la nécropsie on a obtenu des positives du germe causant des lésions pulmonaires et hépatiques examinées. Les souches isolées 82 ont été vérifiées à l'examen bactériologique, se démontrant chez deux d'entre elles la production de SH_2 . Les caractères culturels et biochimiques des germes isolés nous permettent de les ranger parmi les espèces du genre *Pseudomonas* (*Pseudomonas aeruginosa*). Les épreuves sérologiques quoique de peu de valeur pour ces cas, ont donné des titres d'anticorps dont les valeurs oscillaient de 1:10 à 1:320.

Les épreuves avec des antibiotiques, démontrent la forte résistance de cette espèce de germes aux antibiotiques d'emploi fréquent tels, que la chloromycétine, la terramycine, la streptomycine, la novobiocine, l'érythromycine, etc. etc. incluse la polymyxine B, ce dernier antibiotique étant fort sélectif pour le traitement des infections dues au *Bacillus pyocyaneus*; à cet égard nous avons pu confirmer que seulement 32 des 82 souches étudiées ont montré de la sensibilité les épreuves avec des disques d'antibiotiques employés couramment à nos laboratoires. Les autres souches ont donné des chiffres de sensibilité très élevées représentant des valeurs difficiles à atteindre par le sang et d'autant plus dans les tissus corporels.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Samuel S. Wright, M. D. Kenneth Gale Potee and Maxwell Finland, M. D.: American Journal of Clinical Pathology, Vol. 24 No. 10, Oct. 1954.
- 2.—J. Planelles y A. Jaritonova: Efectos nocivos consecutivos al empleo de antibióticos en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Editorial Progreso, Zubovskii, Moscú, U. R. S. S.
- 3.—A. Merchant, R. A. Packer: Bacteriología y Virología Veterinarias.
- 4.—Ernesto Cervera: Tratado de Bacteriología, 4ta. edición, 1959.
- 5.—Bergey: Manual of Determinative Bacteriology, 7ma. edición, 1957.
- 6.—A. Galdo y M. Cruz: Progresos de Medicina Infantil, 1956.
- 7.—Zinsser, J.: Bacteriología, 2da. edición en español, 1959.
- 8.—Jawetz Ernest: Manual de Microbiología.
- 9.—Topley and Wilson: Bacteriología e Inmunidad, 1949.
- 10.—Jawetz Ernest: British Medical Journal, Antibiotics Revisited, Oct. 19, 1963.
- 11.—J. Jedlickova, F. Vymola: Sensitivity of The Genus *Pseudomonas* to Antibiotics. Journal of Hygiene, Epidemiology Microbiology and Immunology, IX, 111, 1965.
- 12.—Alfredo Actis Duto, María Teresa Painceira y Lidia Pilar Salgado: Sensibilidad in vitro a los agentes antimicrobianos y antibióticos de 118 cepas de *Pseudomonas aureoginosa* por el procedimiento de difusión. La Prensa Médica Argentina, Vol. XLIX, No. 48, Nov. 30, 1962.
- 13.—W. H. Saunders: Respiratory Infections and Antimicrobial Therapy. Archives of Otolaryngology, Vol. 78 No. 2, August, 1963.
- 14.—Jedlickova, Z. F. Vymola: Sensibilidad del género *pseudomonas* a los antibióticos. Información temática de antibióticos.
- 15.—J. Deluc Talens, J. Mico Catalán y G. Soler Roca con la colaboración de L. Costés, J. Soler, J. Santa Pau y C. Cortés, Infección Bacterianas Agudas en el lactante, Progresos de Pediatría y Puericultura, Vol. VII, Fascículo 2o., Año 1964.
- 16.—Boris K. Sokolov, Victoria Balayan: Microflora en los procesos purulentos-inflamatorios y su sensibilidad a los antibióticos y quimioterápicos, Boletín del Hospital Lenin, Vol. I No. 1, Septiembre, 1966.