

La intuición estadística de Pasteur y Dieulafoy

Drs. Francisco C Herrera*, José M Avilán Rovira**

RESUMEN

En el presente trabajo se realiza un análisis estadístico de los ensayos de Pasteur para comprobar la efectividad de su vacuna contra el carbón y el papel etiológico de la bacteria carbonosa en el desarrollo de esta enfermedad. Asimismo, se estudian estadísticamente las experiencias de Dieulafoy en las que investigó la posibilidad de transmitir la tuberculosis por inoculación y por contagio. Pasteur inoculó 25 carneros con cultivos atenuados de bacteria carbonosa; otros 25 no lo fueron. Al cabo de 26 días todos fueron inoculados con bacterias virulentas. Otros 10 carneros sirvieron de testigos y no fueron vacunados ni inoculados. De los 50 carneros inoculados sobrevivieron 25, todos los vacunados, y murieron 25, los no vacunados. La prueba de χ^2 sin corrección de Yates indica que la probabilidad de que este resultado fuera fortuito es $< 0,0001$. Esto confirma la hipótesis que la vacuna era altamente efectiva. La comparación de la tasa de mortalidad entre los 50 inoculados con los 10 testigos también arrojó resultados altamente significativos a favor de que la bacteria juega un papel etiológico en el carbón. Dieulafoy inoculó 16 monos con material tuberculoso humano. De estos murieron 12 tuberculosos. De 28 animales testigos no inoculados y protegidos de todo contagio, sólo murió 1. La prueba exacta de Fisher arrojó una probabilidad $< 0,0001$ de que el resultado hubiera sido fortuito. Estos experimentos demuestran satisfactoriamente que la tuberculosis es inoculable. Para intentar demostrar la naturaleza contagiosa de la tuberculosis, Dieulafoy hizo convivir 24 monos sanos con los 16 inoculados. De estos 24 monos murieron 5. La comparación con los 28 monos testigos (de los que murió sólo uno) arroja un valor de 0,0836 para la prueba exacta de dos colas. De manera que este experimento no es concluyente. Se desprende de los diseños experimentales de los autores que estos estaban dotados de una fuerte intuición estadística.

* Miembro Correspondiente Nacional.

** Individuo de Número.

INTRODUCCIÓN

Los médicos modernos tendemos a considerar las teorías de nuestros predecesores como ingenuas y primitivas sin tomar en cuenta que para su época ellos fueron verdaderos gigantes que realizaron importantes aportes al conocimiento médico. Si hoy en día nos vanagloriamos que podemos ver muy lejos es porque somos hormigas paradas en la cabeza de estos gigantes.

Hoy día atribuimos a los criterios de certidumbre obtenidos de las pruebas estadísticas un valor casi mágico y se nos olvida que, antes de existir explícitamente estos criterios, se realizaron descubrimientos científicos fundamentales producto de la observación en unos casos y de la experimentación en otros. La intuición estadística o criterios estadísticos inconscientes parecen haber guiado a estos investigadores. Esto se hace más evidente si se toma en cuenta el hecho de que la estadística es una disciplina de reciente data.

Algo arbitrariamente, podemos considerar que los trabajos de Blaise Pascal (1623-1662) y Pierre Fermat (1601-1665) sobre la probabilidad, podrían ser el inicio de una serie de investigaciones matemáticas sobre el azar, la probabilidad y el error estadístico. Estos primeros esbozos son desarrollados rápidamente por Jacques Bernoulli (1654-1705) que describe la distribución binomial la cual luego será extendida por Simeon Poisson (1781-1840) a observaciones donde el número de observaciones es grande y la probabilidad de que ocurra un evento particular es pequeña (distribución de Poisson). Abraham de Moivre (1667-1754), Pierre Simon de Laplace (1749-1827) y Karl Friedrich Gauss (1777-1855) desarrollan el análisis matemático que conduce a lo que modernamente se

denomina la distribución normal y muy frecuentemente de Gauss, aunque en realidad, en forma independiente, contribuyeran a su desarrollo Bernoulli, De Moivre, Laplace y Quetelet.

En el siglo XIX el astrónomo belga Adolphe Quetelet (1796-1874) combinó la teoría y práctica estadísticas y aplicó la curva normal a problemas de la biología, la medicina y la sociología. Es sólo a fines del siglo XIX y comienzos del XX cuando se inicia el desarrollo de los métodos estadísticos empleados actualmente. Francis Galton (1822-1911) desarrolló y aplicó los métodos de correlación y regresión a mediciones biológicas. Karl Pearson (1857-1936) publicó en 1900 el método del χ^2 para el análisis de proporciones y de la bondad del ajuste. W.S. Gosset (1876-1937) en 1908 publicó su conocida prueba de t. Sir Ronald A Fisher (1890-1962) desarrolló la prueba exacta que lleva su nombre y el poderosísimo método del análisis de varianza (1-8).

El presente trabajo analizará las experiencias llevadas a cabo por Georges Dieulafoy y Louis Pasteur. El primero trató de comprobar experimentalmente la naturaleza contagiosa e infecciosa de la tuberculosis y el segundo intentaba demostrar la efectividad de su vacuna contra el carbunco. Aplicaremos los métodos estadísticos contemporáneos a estas experiencias para determinar a qué conclusiones conducen estas experiencias de acuerdo con los criterios estadísticos actuales.

Antes de entrar a considerar el desarrollo experimental en sí, debemos situarnos en la época en la cual se llevaron a cabo los trabajos de estos autores.

En los años iniciales del siglo XIX contendían de un lado las escuelas de Brown y Broussais, que a pesar de combatirse sañudamente, tenían una base común: consideraban que la vida se mantenía por los excitantes, según Brown o por los estimulantes según Broussais. Según ellos no existía sino una sola causa morbífica, la aplicación excesiva o intempestiva de excitantes o estimulantes al cuerpo del hombre. Obviamente esta doctrina conspiraba contra el concepto de la especificidad de las enfermedades y hubiera retrasado el progreso de la nosografía si no hubiera sido combatida por los grandes clínicos de la época como Laennec, Bretonneau, Trousseau y Dieulafoy entre otros, quienes atribuyeron a cada causa morbífica especial una respuesta de carácter específico por parte del organismo. Las especies nosológicas serían comparables a las especies

vegetales como ya lo había observado Sydenham en 1665-1666 (9).

Como resultado de la observación clínica, se sospechaba la naturaleza contagiosa e infecciosa de la tuberculosis (tbc). Se consideraba contagiosa por su posible propagación de individuos enfermos a sanos por contacto directo o mediante fomites e infecciosa porque parecía resultar de un mecanismo fisiopatológico generado por la penetración de un virus o un parásito unicelular o multicelular en el organismo humano que se multiplicaba y generaba fenómenos directos a través de sus productos metabólicos o indirectos por las reacciones de defensa del huésped (10). En cuanto al carbunco, ya en 1849 Pollender había observado los bacilos en la sangre de carneros muertos por esta enfermedad y Davaine descubrió que podía transmitir el carbunco del cordero al conejo inoculando estos últimos con sangre de corderos enfermos (11). Así se confirmaba la naturaleza contagiosa e infecciosa de esta enfermedad.

Pasteur realizó su experiencia en 1881 (12) y Dieulafoy (13) publicó sus experiencias en 1883. Estas fechas anteceden en muchos años la publicación de los métodos estadísticos apropiados para el estudio comparativo de las proporciones (2): Pearson como ya se dijo publicó el análisis del χ^2 en 1900 y Fisher, autor de la prueba exacta, nació en el año de 1890, 7 años después de las experiencias de Dieulafoy y 9 años después de la experiencia de Pasteur.

Una vez establecido el telón de fondo sobre el que se desarrollaron las experiencias de estos investigadores, pasemos a analizarlas.

Métodos experimentales

Con el fin de determinar la significación estadística de los resultados de las experiencias de Pasteur y Dieulafoy, estos fueron sometidos a la prueba de χ^2 y a la prueba exacta de Fisher.

Experiencia de Pasteur

La descripción del experimento de Pasteur ha sido tomada de la obra "Vida de Pasteur" de Manuel Martínez Báez (12).

Ensayo de la efectividad de la vacuna contra el carbunco. El 5 de mayo se inició en la granja *Pouilly-le-Fort* cerca de Melun el ensayo de Pasteur con el cual Pasteur intenta demostrar la efectividad

de una vacuna contra el carbunco preparada con cultivos de bacilos atenuados. Para el experimento se emplearon 60 carneros. Ese día se inocularon 25 carneros con un cultivo atenuado de la bacteria carbonosa y marcados para su identificación. Los restantes animales no fueron tocados. El 17 de mayo se hizo una nueva inoculación con un cultivo menos atenuado y el 31 del mismo mes se inocularon tanto los 25 animales inoculados previamente con cultivos atenuados como los 25 animales que no recibieron la vacuna con bacilos plenamente virulentos. Los diez carneros restantes sirvieron de testigos y no fueron vacunados ni inoculados con bacilos virulentos.

Investigación sobre el papel etiológico de la bacteria en el carbón. La comparación de los resultados obtenidos en los 50 animales inoculados, previamente vacunados y no vacunados, con los 10 animales testigos permitiría determinar si la bacteria juega algún papel en la etiología del carbón.

Experiencias de Dieulafoy

En el número 3 del *Arch de Physiologie* de marzo de 1883 Dieulafoy publicó sus experimentos sobre la inoculación y contagio de la tbc (13).

Experimento de inoculación. En este experimento se inocularon 16 monos con material tuberculoso humano. Estos se compararon con 28 monos testigos no expuestos a inoculación o contacto con monos tuberculosos.

Experimento de contagio. En este experimento 24 monos vivieron en contacto con los 16 monos inoculados del experimento anterior. Estos se compararon con los mismos 28 monos testigos no expuestos a contagio con tbc.

RESULTADOS

Experiencia de Pasteur

Ensayo de la efectividad de la vacuna contra el carbunco. El 2 de junio de 1881, cuatro semanas después de haberse aplicado la primera dosis de vacuna y dos días después de la inoculación con la bacteria virulenta, se reúne un numeroso grupo de veterinarios y periodistas para constatar los resultados de la experiencia. Había 22 cadáveres de los carneros no vacunados y los otros 3 estaban moribundos. Los 25 vacunados estaban sanos.

Estos resultados con su análisis estadístico se presentan en el Cuadro 1. La prueba de χ^2 sin la corrección de Yates para la continuidad arrojó un valor de 39,29. Para este valor estadístico se corresponde una probabilidad < 0,0001 de que este resultado haya sido fortuito. Como se trata de una muestra de 50 animales, relativamente grande, según Yule y Kendall (14) y todas las frecuencias esperadas son mayores a 5, la corrección resulta innecesaria.

Si consideramos a los moribundos como muertos, entre los no vacunados habrían 25 muertos (o sean todos) y entre los vacunados habrían 25 vivos (o sea todos). El Cuadro 2 resume los resultados del análisis estadístico. También la probabilidad calculada con la prueba χ^2 indica que este resultado haya sido fortuito era muy remota, < 0,0001.

Cuadro 1

Experimentos de Pasteur sobre efectividad de la vacuna del carbunco
Análisis de 50 animales inoculados: 25 no vacunados y 25 vacunados
Tres animales moribundos considerados como vivos

	No vacunados	Vacunados	Total
Muertos	22 [11]	0 [11]	22
Vivos	3* [14]	25 [14]	28
Total	25	25	50

* moribundos

χ^2 (df= 1) 39,29 P= 0,0000

Cifras entre corchetes: frecuencias esperadas.

Como todas estas probabilidades son mucho menores que 0,05, el criterio escogido por la generalidad de los investigadores para definir la significación estadística, se puede considerar que Pasteur demostró fehacientemente la efectividad de su vacuna contra el carbunco.

El diseño de este experimento es impecable. Pasteur realizó la comparación simultánea de un grupo experimental (vacunados) con un grupo control (no vacunados) lo cual elimina un error común en muchos experimentos: comparar dos grupos tratados a tiempos diferentes. Empleó igual número de animales, veinticinco, en ambos grupos lo cual resulta en un tratamiento estadístico más eficiente.

Cuadro 2

Experimentos de Pasteur sobre efectividad de la vacuna del carbunco
Análisis de 50 animales inoculados: 25 no vacunados y 25 vacunados
Tres animales moribundos considerados como muertos

	No vacunados	Vacunados	Total
Muertos	25 [12,5]	0 [12,5]	25
Vivos	0 [12,5]	25 [12,5]	25
Total	25	25	50

χ^2 (df= 1) 50 P= 0,0000
Cifras entre corchetes: frecuencias esperadas.

Es interesante notar el altísimo grado de significación estadística, $P < 0,0001$, en todas las pruebas en ambos casos. Esto sugiere que Pasteur exageró en el número de animales, pues ya en experiencias anteriores había obtenido resultados similares con números menores.

Obviamente Pasteur, con buen criterio experimental intuitivamente estableció un buen factor de seguridad en este experimento cuyo fracaso lo habría desacreditado ante este público de observadores escépticos.

Investigación sobre el papel etiológico de la bacteridia en el carbón. El Cuadro 3 resume los resultados de la comparación entre la proporción de carneros muertos en los 50 carneros inoculados con la bacteridia virulenta, tanto previamente vacunados como no vacunados, y los 10 carneros testigos, ni vacunados ni inoculados. De los inoculados, los 25 vacunados sobrevivieron y los 25 no vacunados murieron todos.

Al comparar este resultado con el de los 10 testigos, no vacunados ni inoculados, entre los que la supervivencia fue total mediante la prueba de χ^2 obtenemos valores de $P < 0,001$. Claramente es muy poco probable que estos resultados fuesen fortuitos. Como puede observarse sólo una de las frecuencias esperadas resultó menor a 5, lo cual representa menos del 20 % del total de frecuencias, porcentaje que según Cochran es apropiado en tablas con más de un grado de libertad (15).

Cuadro 3

Experimentos de Pasteur: demostración del papel etiológico de la Bacteridia del carbón
Análisis de 50 animales inoculados: 25 no vacunados y 25 vacunados vs. 10 testigos ni vacunados ni inoculados

	Inoculados		No inoculados	Total
	Vacunados	No vacunados		
Muertos	0 [10,42]	25 [10,42]	0 [4,17]	25
Vivos	25 [14,58]	0 [14,58]	10 [5,83]	35

Todos 25 25 10 60
 χ^2 (df=2) 60,0 P= 0,0000
Cifras entre corchetes: frecuencias esperadas.

Experiencias de Dieulafoy

Experimento de inoculación. El Cuadro 4 resume los resultados de la inoculación con material tuberculoso humano (13). De los 16 monos inoculados, 12 murieron y 4 permanecieron sanos en comparación con los 28 testigos, alejados de todo contagio, de los que sólo uno murió por tbc. Como una de las frecuencias esperadas es menor a 5, lo cual representa el 25 % del total de frecuencias, no puede aplicarse la prueba de χ^2 y se utiliza la prueba exacta de Fisher. La P calculada fue $< 0,0001$.

Dado que no se sabe a priori si la inoculación va a incrementar o disminuir el número de animales muertos entre los inoculados, se justifica el empleo de la prueba exacta de Fisher de dos colas.

Experimento de contagio. El Cuadro 5 resume los resultados de la exposición de 24 monos sanos al contacto con los 16 monos inoculados con material tuberculoso en el experimento anterior, de los cuales 12 murieron de la enfermedad (13). De estos 24 monos expuestos a contagio 5 murieron y 19 permanecieron vivos. Estos fueron comparados con los 28 monos testigos, protegidos de todo contagio tuberculoso de los que sólo murió uno.

Como el 50 % de las frecuencias esperadas resultaron menores a 5, la probabilidad se calculó mediante la prueba exacta de Fisher, para dos colas la cual fue de 0,0836. Esta probabilidad es mayor que 0,05, el criterio escogido por la generalidad de los investigadores para definir la significación estadística. De modo que en este experimento

Cuadro 4

Experimentos de contagio de Dieulafoy.
 Demostración del carácter inoculable de la tbc
 Comparación de 16 monos inoculados con tbc vs 28
 monos no expuestos a contagio con tbc

	Inoculados	No expuestos	Total
Muertos	12 [4,73]	1 [8,27]	13
Vivos	4 [11,27]	27 [19,73]	31
Total	16	28	44

Prueba exacta, 2 colas P= 0,0000

Cifras entre corchetes: frecuencias esperadas.

Cuadro 5

Experimentos de contagio de Dieulafoy.
 Investigación sobre el carácter contagioso de la tbc
 Mortalidad en 24 monos expuestos a los 16 monos
 inoculados con tbc del experimento de inoculación
 comparada con la mortalidad en 28 monos no expuestos
 a inoculados

	Expuestos a inoculados	No expuestos a inoculados	Total
Muertos	5 [2,77]	1 [3,23]	6
Vivos	19 [21,23]	27 [24,77]	46
Total	24	28	52

Prueba exacta, 2 colas P= 0,0836

Cifras entre corchetes: frecuencias esperadas.

Dieulafoy obtuvo resultados que sugieren pero no prueban estadísticamente el carácter contagioso de la tuberculosis, considerando como criterio de contagio la muerte por la enfermedad.

DISCUSIÓN

Experiencia de Pasteur

Ensayo de la efectividad de la vacuna contra el carbunco. La contundencia de los resultados de la experiencia pública sobre la efectividad de la vacuna anticarbonosa llevados a cabo en *Pouilly-le-Fort* sugieren que Pasteur tenía cierta información previa que le aseguraba un resultado exitoso. Esta información, podría resultar de experimentos de

laboratorio asociados al desarrollo de la vacuna o de experimentos piloto llevados a cabo antes de la presentación pública. De otra forma habría sido arriesgado llevar a cabo un experimento público ante la prensa.

La solución que aplicó este investigador era la más sensata: usar el mayor número posible de animales, esto le aseguró su éxito publicitario.

Investigación sobre el papel etiológico de la bacteridia en el carbón. Los resultados de esta comparación, exhiben una alta significación estadística, como los del ensayo de la vacuna anticarbonosa. Esto lo explica el hecho de que existen 25 animales vacunados sobrevivientes entre los 50 inoculados y los 10 no inoculados sobrevivieron todos. Si se hubieran comparado los animales inoculados no vacunados con los testigos también se obtendría una alta significancia estadística con la prueba exacta de Fisher. Pasteur incluyó este grupo para asegurarse que los inoculados no hubieran muerto por una causa ajena a la bacteridia y que pudiera afectar a ambos grupos.

Experiencias de Dieulafoy

Experimento de inoculación. Los resultados de estos experimentos (Cuadro 4) fueron contundentes. El número de animales fue suficiente para detectar la magnitud de la diferencia entre las proporciones de animales afectados entre testigos e inoculados. Dieulafoy demostró fehacientemente que la tbc podía transmitirse de un animal a otro por inoculación.

Experimento de contagio. Aunque los resultados del ensayo de contagio por convivencia entre monos infectados y sanos no arrojaron resultados estadísticamente significativos, sí sugieren que la enfermedad es contagiosa.

Es indudable que los resultados del experimento de inoculación de Dieulafoy demuestran fehacientemente que la tbc es inoculable. Los resultados de los experimentos de contagio arrojaron resultados dudosos, pero sugieren que la tbc es contagiosa.

Obsérvese que el criterio utilizado para evaluar el contagio fue la muerte por la enfermedad.

En todo caso empleó un buen diseño experimental con grupos experimental y testigo estudiados simultáneamente.

En conclusión, para los años 80 del siglo XIX no existían métodos estadísticos específicos para estimar con precisión la significación estadística de

la diferencia entre dos o más proporciones, en este caso animales muertos/total de animales en el grupo experimental y animales muertos/total de animales en el grupo testigo. No obstante investigadores de la talla de Pasteur y Dieulafoy ya tenían un criterio estadístico intuitivo tan efectivo como las pruebas estadísticas modernas. Contrariamente al burgués gentilhomme de Molière, que, por su ignorancia, no se percataba de que hablaba en prosa sin saberlo, estos investigadores, por su gran intuición experimental, aplicaban la estadística sin conocerla.

REFERENCIAS

1. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Bioestadística médica. México: Editorial El Manual Moderno SA. de C.V.; 1997.
2. Fisher RA. Statistical methods for research workers. Londres: Oliver and Boyd; 1963.
3. Hassard TH. Understanding biostatistics. St. Louis: Mosby Year-Book, Inc.; 1991.
4. Hill AB. Texto básico de estadística médica. Buenos Aires: Librería "El Ateneo" Editorial; 1980.
5. Lison L. Statistique appliquée á la biologie expérimentale. París: Gauthier-Villars; 1968.
6. Mason SF. A history of the sciences. New York: Collier Books; 1966.
7. Sokal RR, Rohlf FJ. Biometry. New York: WH Freeman and Co.; 1981.
8. Young HD. Statistical treatment of experimental data. New York: McGraw-Hill Book Co., Inc.; 1962.
9. Trousseau A. Clinique médicale de l'Hotel Dieu de Paris. París: Librairie J-J. Bailliére et Fils; 1873.
10. Schreiber W, Mathys FK. Infectio. Historia de las enfermedades infecciosas. Basilea: Ediciones <Roche>; 1987.
11. Taylor GR. Histoire illustrée de la biologie. París: Librairie Hachette; 1963.
12. Martínez Báez M. Vida de Pasteur. México: Fondo de Cultura Económica; 1996.
13. Dieulafoy O. Manual de patología interna. Madrid: Administración de la Revista de Medicina y Cirugía Prácticas; 1889.
14. Yule GU, Kendall MG. Introducción a la estadística matemática. 14ª edición. Madrid: Aguilar; 1967.
15. Swinscow TDV. Statistics at Square one. 8ª edición. Londres: Br Med Assoc; 1990.

...continuación de la pág. 293.

Habiendo trabajado en epidemias de cólera en Filipinas (1961), Calcuta, India (1962), Vietnam (1963), Tailandia (1966) y Taiwán (1967), estoy perfectamente consciente de las dificultades para controlar brotes y ofrecer atención médica, cuando los recursos son limitados o no existen. De hecho, el cólera ocurre en proporciones epidémicas en estas condiciones. La gran pandemia actual de cólera, ampliamente reconocida como la séptima, se inició en 1961 y llegó al Hemisferio Occidental, por vez primera en un siglo, con un brote explosivo en Perú en enero de 1991. (Muchos de nosotros habíamos predicho con anterioridad [Finkelstein RA. Cholera. CRC Crit Rev Microbiol 1973;2:553-623] que el cólera podría entrar en Sur América desde África no desde el oeste en los años setenta). Para finales de año, en el Perú se habían reportado más de 300 000 casos. La tasa de letalidad fue menor al 1 %, debido

a la efectiva intervención médica precoz (el cólera, no tratado puede matar hasta el 70 % de la gente que la padece y la tasa de letalidad es muchas veces más elevada en África). El cólera luego se propagó a través de Sur América y América Central, siguiendo las rutas del transporte humano, llegando a Venezuela, como se informa en el libro, en noviembre de 1991. Rápidamente alcanzó la región deltana del río Orinoco, cuando tropezó con Briggs, donde, como él dice, "nueve de mis amigos más cercanos habían muerto y los sobrevivientes estaban aterrados". Se puede en este momento afirmar categóricamente que dichas muertes por cólera se debieron a faltas en la atención médica. El porqué de la ocurrencia de estas fallas es el objetivo principal del libro.

Va a la pág. 330...