

Tétanos

Aislamiento de una cepa altamente toxigénica de *Clostridium tetani* y su valoración con fines de inmunización activa

J. A. Galán Torres¹, J. M. Pérez García², P. Moratinos Palomero³,
J. L. Iglesias Olmeda⁴, A. Serrano Valin⁵

RESUMEN

Antecedentes: el tétanos está provocado por la acción de una potente neurotoxina producida por *Clostridium tetani* y mediada por un plásmido. La pérdida de toxicidad bacteriana en condiciones de laboratorio, y concretamente en los clostridios, no es un hecho infrecuente y tiene una decisiva repercusión en la preparación de vacunas. Tras la utilización durante años de una cepa de *C. tetani* de un alto poder toxigénico, nos encontramos con una súbita y total atenuación de la misma lo cual nos llevó, después de diversos ensayos no satisfactorios con cultivos de diferente origen, a aislar el germen del suelo.

Objetivos: evaluar la posibilidad de revitalizar una cepa que ha perdido su toxicidad y, si ello no fuera posible, determinar el mejor procedimiento de aislamiento de una nueva cepa toxigénica —a partir del suelo—, sus características de crecimiento, el método para aumentar la producción de toxina y su valoración.

Lugar de realización: Servicio de Microbiología del Centro Militar de Veterinaria, donde se prepara la vacuna antitetánica para la inmunización del ganado equino dependiente del Ministerio de Defensa.

Diseño: aislamiento de *C. tetani* a partir de muestras de tierra, producción y valoración de la exotoxina en ensayo biológico en animal receptivo.

Material y métodos: método termo-químico para aislamiento de anaerobios en medios líquidos reducidos y glucosados a pH ácido y en medios sólidos enriquecidos en anaerobiosis estricta a una sobrepresión de 0,2 bar. Inoculación en cobayas.

Resultados: la nueva cepa de *C. tetani* presentó una alta producción de toxina, con una dosis letal intramuscular para el cobaya de 350 grs. de peso de un mililitro de dilución 1:100.000 de toxina bruta.

Conclusiones: 1) en la experiencia de los autores, las cepas que han perdido su toxicidad, no son recuperables; 2) la prueba de toxicidad en animal receptivo es condición imprescindible cuando se quiere utilizar dicha cepa con fines de inmunización activa; 3) la incubación prolongada en medios proteicos, peptonados y glucosados incrementa al menos diez veces la producción de toxina; 4) la permanencia en medios artificiales lleva aparejada la no formación de esporos; 5) los medios líquidos reducidos a pH ácido son muy adecuados para el crecimiento inicial y mantenimiento del bacilo tetánico y 6) la nueva cepa de *Clostridium tetani* aislada (G-94) se encuentra disponible en el Centro Militar de Veterinaria y ha quedado depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo con el número 4629.

PALABRAS CLAVE: tétanos - *Clostridium tetani* - aislamiento - anatoxina

Med Mil (Esp) 1996;52 (2): 130-134

INTRODUCCIÓN

El tétanos pertenece al grupo de enfermedades transmitidas por contacto directo, en las que existe una solución de continuidad de la piel o mucosas (1). Las puertas de entrada del esporo

son muy diversas. Normalmente suelen ser heridas contaminadas con tierra, lodo, aguas estancadas y heces, sobre todo en las zonas rurales. Sin embargo, en ocasiones, la vía de entrada es mínima y puede pasar desapercibida. Se ha podido constatar que los esporos que contaminan los proyectiles de armas de fuego permanecen acantonados largo tiempo en la herida, pudiendo desarrollarse la infección por la acción de agentes externos.

Fracturas abiertas, heridas de guerra, las sufridas por agricultores y ganaderos, cornadas, accidentes de tráfico, quemaduras, congelaciones, mordeduras y arañazos, intervenciones quirúrgicas, partos y abortos en condiciones deficientes, el cordón umbilical en el neonato, castraciones y heridas del casco del caballo, etc. son las vías de entrada más frecuentes del bacilo tetánico (1,2).

El período de incubación es variable, aunque en la gran mayoría de los casos suele ser inferior a 14 días, dependiendo de los caracteres de la herida, el grado de inmunización y de las propias características del germen. Los períodos de incubación cortos suelen ir unidos a una mayor gravedad del cuadro clínico y un peor pronóstico (3,4).

¹ Cte. San. Vet.

² Cor. San. Vet. Jefe de Servicio

³ TCol. San. Med.

⁴ Cte. San. Vet. Jefe de Servicio

⁵ Analista

Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos, Centro Militar de Veterinaria (doctores Galán, Iglesias, y Serrano). Servicios de Medicina y Cirugía Experimental (Dr. Pérez) y de Anatomía Patológica (Dr. Moratinos), Hospital Militar Central «Gómez Ulla». Madrid.

Dirección para la correspondencia: Dr. D. Juan Alberto Galán. Servicio de Microbiología y Análisis Clínicos, Centro Militar de Veterinaria. c/ Darío Gazapo, 3. 28024 Madrid.

Fecha de recepción del manuscrito: 10 de marzo de 1996; en forma revisada: 24 de abril de 1996

Fecha de aceptación del manuscrito: 25 de abril de 1996

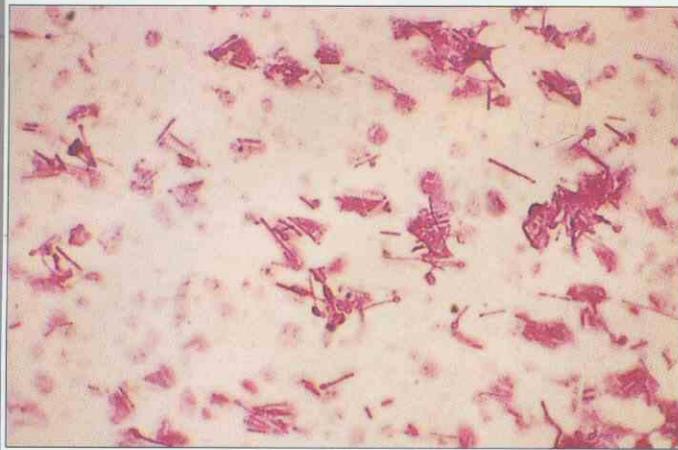


Figura 1. *Clostridium tetani* mostrando su típico esporo terminal (x1.000).

La toxina tetánica es un veneno muy activo, un mililitro de filtrado de un cultivo basta para matar un caballo (5). La cantidad de toxina necesaria por gramo de peso corporal para matar una gallina es 350.000 veces mayor que en el caso del caballo. En el perro es aproximadamente 600 veces mayor (6). En el hombre, 0,00025 g de toxina tetánica son suficientes para provocar la muerte, mientras se requiere 20 veces más de veneno de cobra y unas 150 veces más de estricnina (7). La toxicidad varía mucho según las cepas de bacilos; algunas de las cuales pierden, con el tiempo, el poder que antes tenían de formar toxinas muy enérgicas (5).

La toxina contiene diversas proteínas y una proteasa y se libera por difusión (8,9). Mediante electroforesis se ha comprobado que la mayor proporción de los 13 aminoácidos que contiene corresponden al ácido aspártico, ácido glutámico, isoleucina y leucina; el peso molecular se estima en 67.286 daltons (4). La toxina posee diversos y diferentes lugares antigénicos, pero sólo uno influye en la producción de anticuerpos neutralizantes (4).

Los clostridios y otras bacterias productoras de toxinas con relativa frecuencia pierden su toxicidad cuando son mantenidas en el laboratorio durante largos períodos de tiempo. Esto puede considerarse un signo de debilitamiento dado que, en muchas ocasiones, se acompaña de una disminución de la vitalidad del germen, llegando incluso a perecer.

Este fenómeno es de suma importancia para la elaboración de anatoxinas como la diftérica, tetánica, estafilocócica, etc. debido a que la respuesta inmune se basa precisamente en la inactivación de la toxina con formaldehído. Hay que señalar que la toxina tetánica intacta no produce, sin embargo, inmunidad, motivo por el cual la enfermedad puede padecerse repetidamente.

La cepa de *C. tetani*, empleada por nosotros durante años con un alto poder toxigénico perdió, sin embargo, súbitamente su capacidad para producirla, debilitándose a continuación su crecimiento en los medios de cultivo. En un primer momento se intentó sustituirla por otras cepas suministradas por diferentes laboratorios públicos y privados sin obtener resultados, ya que demostraron ser atóxicas en las correspondientes pruebas biológicas efectuadas. Debemos señalar que en nuestro laboratorio antes de preparar cada lote de anatoxina, efectuamos los siguientes controles: a) prueba de toxicidad, b) prueba de protección del toxoide y c) prueba de inocuidad y esterilidad del producto preparado.



Figura 2. Crecimiento del bacilo tetánico en medio de Tarozzi. Abundante formación de burbujas de gas.

Lo anteriormente señalado nos llevó a plantearnos el aislamiento del bacilo tetánico a partir del suelo. La difusión del *Clostridium tetani* en el medio ambiente es muy grande, aunque desigual. Es raro en el suelo de los bosques y lugares libres de excrementos de animales. Los aislamientos positivos, según los diversos autores y origen de las muestras, oscilan entre el 8 y 66% (4,6). En nuestro caso, de trece muestras estudiadas obtuvimos resultado positivo en dos (15,3%). A partir de esta nueva cepa se prepara actualmente la anatoxina tetánica en nuestro Centro (figura 1).

En el presente trabajo tratamos de analizar las condiciones de aislamiento del germen del suelo, sus peculiaridades de crecimiento y la valoración de la potencia de la toxina tetánica. También se contemplan los posibles mecanismos responsables de la atenuación de los clostridios.

MATERIAL Y MÉTODO

Existen varias técnicas para el cultivo de anaerobios, nosotros hemos empleado la técnica italiana que utiliza medios reducidos del tipo Tarozzi (10). El mantenimiento de una acidez en los cultivos (pH 5,8) permite obtener una abundante producción de toxina; para ello se emplea una proporción elevada de glucosa (5/1.000) que el bacilo tetánico transforma en ácido, y fosfato monopotásico como tampón ácido (medio de G. Ramón y R. Legroux, 1930)(11). Se intentó revitalizar la cepa atoxigénica mediante el empleo de diferentes medios y condiciones de crecimiento.

Las condiciones anaerobias no son suficientes para el aislamiento de *C. tetani*, dado que un gran número de bacterias son anaerobias facultativas. Por otro lado, cuando se realiza el calentamiento de las muestras o cultivos iniciales, quedan presentes otros clostridios muy difundidos en la naturaleza y cuyas esporas son también resistentes al calor, como por ejemplo: *C. tertium* (esporo fusiforme terminal), *C. sporogenes* (esporo subterminal), *C. innocuum* (esporo terminal), *C. lentoputrescens* (esporo terminal), etc.(3).

Se tomaron muestras de tierra presumiblemente tetanígena (terrenos de granja al abrigo de la radiación solar, donde se cría ganado ovino y caprino, material herrumbroso, etc). A las muestras se añadió suero fisiológico en proporción 1:5. Posteriormente fueron calentadas a 80°C durante 25 min. y sembradas en medios de Tarozzi a pH 5,8 (figura 2).

También se sembraron placas de agar-sangre de caballo al 5%, agar-suero al 8%, agar glucosado al 6% y agar de Schaedler (bioMérieux) con glucosa, cisteína y hemina, que fueron incubadas en jarra para anaerobios con sobres conteniendo borohidruro de sodio, ácido tartárico y bicarbonato sódico (Anaerobic system BR38 Oxoid) y saco de catalizador activo de paladio BR42 (Oxoid) que proporciona 1.800 ml de H₂ y 350 ml de CO₂ con una presión de 0,2 bar (15 cm de Hg). Se utilizaron fajas de material inerte saturado de una solución acuosa tamponada de resazurina como indicador de anaerobiosis.

De los cultivos y muestras originales se realizaron diluciones en caldo nutritivo desde 1:10 a 1:200.000 y posterior inoculación i.m. a un cobaya de un mililitro de la dilución 1:10.000, produciéndole los síntomas típicos de la enfermedad y la muerte a las 48 horas. Se realizaron siembras a partir de líquido tisular y tejido muscular del punto de inoculación.

Tras observar cierta contaminación en algunos tubos de Tarozzi, se realizaron diluciones a partir del caldo de este medio con ácido fénico al 5%, en proporción 1:20, durante unas horas, efectuándose resiembras en nuevos tubos. Con este procedimiento se obtuvo un buen crecimiento del bacilo tetánico, con formación de grandes burbujas de gas que ascienden desde el fondo del tubo.

Para aumentar la producción de toxina se sembraron los cultivos obtenidos en medios de Tarozzi en matraces con el medio de Ramón y Legroux a 37°C durante 9-12 días. Tras filtración se formolizó al 0,5% y se llevó a la estufa a 37°C durante un mes. Una vez desactivada la toxina se realizó un prefiltrado por membrana AP 25 y por SCWPO 90 de 8 micras y una concentración mediante ultrafiltración con Pellicon de 30.000 daltons, quedándonos con lo retenido por el filtro hasta alcanzar una proporción 1:10 del volumen inicial.

Antes del envasado se añadió hidróxido de aluminio al 10% (66 ml por 1.000 ml de anatoxina) como adyuvante, ácido fénico al 0,55% como conservante y un vial de 10⁶ ui de penicilina y 1 gramo de estreptomocina para prevenir el crecimiento bacteriano. El toxoide se debe conservar entre 2 y 10°C, siendo su validez en estas condiciones de unos 2 años.

Se realizó un test de sensibilidad *in vitro* a los antimicrobianos de la nueva cepa, mediante valoración de los halos de inhibición de discos (Difco), en placas de Mueller-Hinton-suero en anaerobiosis.

RESULTADOS

Con el material inicial se provocaron síntomas de tétanos a las 48 horas de la inoculación intramuscular en un cobaya de 350 gramos de peso de 1 ml de la dilución 1:150.000. Los bacilos inoculados en las placas de agar-sangre produjeron esporos al cabo de 24-48 horas de estar en presencia de oxígeno y a temperatura ambiente. Las siembras realizadas a partir del punto de inoculación originaron crecimientos desiguales y una gran contaminación, siendo muchas veces negativas.

No se pudo recuperar la cepa atóxica, a pesar de los repetidos intentos realizados. En los cultivos, la atenuación se manifestó, en primer lugar, por la pérdida prácticamente total de toxicidad, siendo además su crecimiento dificultoso y desigual, produciendo pequeñas y abundantes burbujas en todo el medio y acumulándose en la superficie del mismo.



Figura 3. Colonias de *C. tetani* en medio de Schaedler.

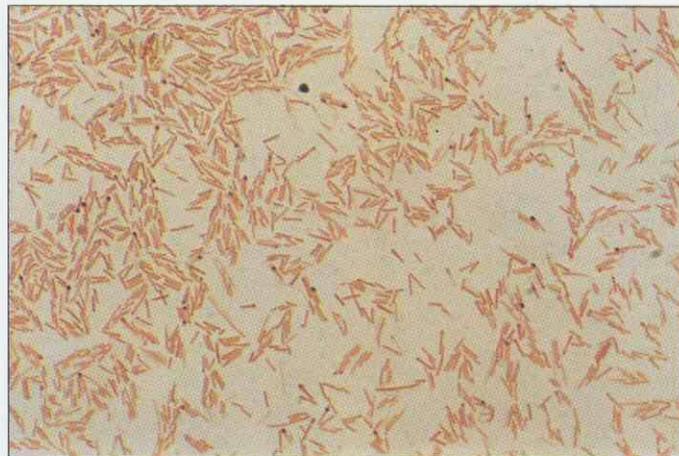


Figura 4. Formación inicial de esporos tetánicos en medio sólido.

Concentración cromática en los extremos de la bacteria (flecha gruesa). Diferentes estadios formativos (flechas finas) (x 1.000).

La nueva cepa presentó un crecimiento abundante en caldo con turbidez y ennegrecimiento inicial del medio, observándose posteriormente un aclaramiento con formación de grandes burbujas de gas que ascienden desde la profundidad del mismo.

En medios sólidos con sangre se observó crecimiento a cabo de 48 horas con formación de colonias desiguales, de bordes irregulares, blanquecinas y con producción de hemólisis β. El crecimiento en agar de Schaedler fue bueno (figura 3), presentando las colonias un color blanquecino con aspecto de copos de algodón. La sobrepresión de 15 cm de Hg demostró ser la más idónea para el crecimiento de *C. tetani*. El bacilo presentó ligera acción sobre la leche tornasolada y discreta cantidad de sulfídrico.

Se pudo observar que el proceso de producción del esporo comienza con la formación de un abultamiento en uno de los extremos de la bacteria en el que se observa una intensa concentración cromática hasta el punto de simular la presencia de un coco gram positivo (figura 4). Seguidamente se produjo un hinchamiento del sector protoplasmático circundante acompañado de una pérdida de coloración que es característica del esporo; en ocasiones quedan restos de material cromático en la periferia del mismo.

El poder tóxico se incrementó al menos diez veces tras el cultivo en el medio de Ramón y Legroux. Es éste un medio



Figura 5. Cobaya muerto tras inoculación intramuscular de toxina tetánica diluida (1: 100.000). Rigidez muscular generalizada.

simple, práctico y económico que favorece a las formas vegetativas y cuyo valor antigénico intrínseco viene determinado por el grado de floculación, de modo que, la inoculación im. de 0,0000066 ml de toxina bruta provoca la muerte en cobaya de 350 gramos en las primeras 96 horas (aproximadamente 30 unidades antigénicas) y síntomas tetánicos a diluciones superiores a 1/200.000 (figura 5).

El formol transforma fácilmente el cultivo en anatoxina tras la incubación a 37-39°C durante un mes, observándose una pérdida mínima del poder antigénico, estimado en un 5-10%.

La cepa de *C. tetani*, aislada por nosotros, era sensible al cloranfenicol, eritromicina, lincomicina, tetraciclina, cefotaxima, ceftriaxona, ácido fusídico, amoxicilina-ácido clavulánico, norfloxacin, ácido nalidíxico y nitrofurantoina. Presentaba sensibilidad intermedia para ampicilina, neomicina, sisomicina y ácido pipemídico.

La especie era resistente a nistatina, penicilina, gentamicina, estreptomina, trimetoprim-sulfametoxazol, sulfadiazina, meticilina, tobramicina, cefixima y polimixina B.

DISCUSIÓN

Con la sola excepción del bacilo diftérico, los organismos que forman exotoxinas poderosas pertenecen casi todos al grupo de los bacilos anaerobios esporógenos. Dos de ellos — *C. botulinum* y *C. tetani*— producen las sustancias más venenosas de cuantas se conocen.

Muchas especies de clostridios son anaerobios obligados, sin embargo, la tolerancia al oxígeno varía ampliamente; algunas pueden crecer, pero no esporular, en presencia de aire a presión atmosférica, a condición de que en el medio se establezca un bajo potencial de óxido-reducción. En este sentido, las muestras procedentes de heridas profundas deben cultivarse rutinariamente en anaerobiosis (12).

Según nuestros resultados, las cepas que han perdido su toxicidad no son recuperables, a pesar de lo publicado en este sentido (4,9), al menos por los procedimientos tradicionales: empleo de sangre y suero de caballo y conejo, estrictas condiciones de anaerobiosis, presencia de glucosa, acidez del medio o resiembra del bacilo en filtrados de caldo de cultivos puros. La propia toxina se atenúa por la acción del calor y del oxígeno.

No se conoce realmente el mecanismo de atenuación súbita de *C. tetani*. La presencia de productos tóxicos de oxidación cuando se les expone al aire, como la formación de peróxido de hidrógeno y otras sustancias (por la ausencia de catalasas y peroxidases en estas bacterias), pueden provocar que los bacilos asporógenos (relativamente aerotolerantes), que no producen la forma de resistencia en condiciones de laboratorio (13) durante largos períodos de tiempo, pierdan la suficiente vitalidad para volverse atóxicos e incluso llegar a perecer. El hecho de que algunas especies de clostridios puedan crecer pero no esporular en presencia de aire a presión atmosférica sería significativo en este sentido (14).

Es posible que puedan verse afectadas enzimas de transferencia, sobre todo transaminasas, que proporcionan a la célula bacteriana la capacidad de sintetizar los aminoácidos necesarios para la formación de proteínas (15). Estas enzimas, como las demás, son termolábiles y su actividad se ve modificada por el pH, la temperatura, etc. También influiría en este proceso la carencia de piridoxina (piridoxal fosfato).

Todas las especies producen fenol (14). Éste y otros productos metabólicos podrían actuar nocivamente sobre las formas vegetativas del clostridio, como ocurre en otras bacterias con los metabolitos producidos durante su crecimiento.

En nuestra opinión, especímenes mantenidos en colecciones tipo y en laboratorios productores de vacuna antitetánica pueden haber perdido, en gran parte, su poder toxigénico y dado que la producción de toxina es imprescindible para la obtención de toxoide inmunizante, es necesaria siempre su valoración en un animal receptivo.

Cuanto más prolongado es el período de incubación, tanto mejor es el pronóstico y a la inversa. En nuestra experiencia, la forma crónica de tétanos se produce cuando el período de incubación excede de 4-5 días en el cobaya y de 8 en el conejo. Los síntomas suelen durar 7 u 8 semanas y el animal acaba por curarse completamente. Esta forma se produce generalmente cuando existe un cierto grado de inmunidad o, sobre todo, si la cantidad de cultivo inoculado es pequeña (altas diluciones), quedando limitados los síntomas al miembro inoculado.

Sin embargo, como hemos podido comprobar repetidamente, el padecimiento del tétanos no confiere inmunidad. La enfermedad puede contraerse de nuevo e incluso llegar a provocar la muerte (1).

La sensibilidad a los antimicrobianos que ha presentado nuestra cepa es similar a la referida en la bibliografía (4,6,14), sin embargo, debemos destacar la resistencia que ha mostrado frente a la penicilina (la cual puede inhibir *in vitro* la formación de los esporos), como ya ha sido comunicado por algunos autores (4).

La anatoxina tetánica tiene un valor intrínseco, como revela la reacción de floculación, es decir, que además de su atoxicidad conserva plenamente su capacidad o poder antigénico. Esta capacidad ya fue demostrada por dos vías: 1. La anatoxina flocula en presencia de la antitoxina (igual que la toxina) pero de manera más fina y exacta, pudiéndose utilizar ventajosamente para la titulación de los sueros. Además la anatoxina es más estable. 2. La fuerte inmunidad experimental que provoca en el conejo y cobaya.

El poder inmunizante del toxoide, cuando se utiliza una cepa idónea, es muy alto, sólido, inocuo y duradero (2); coba-



Figura 6. Centro Militar de Veterinaria. Madrid.

yas inmunizados en nuestro laboratorio pueden resistir, sin ninguna sintomatología, inoculaciones intramusculares de 0,1 ml de toxina bruta 21 días después.

Desde los comienzos de su aplicación en 1928, la eficacia de la vacunación antitetánica ha sido demostrada en diversos estudios experimentales en el caballo (16). En nuestra experiencia, tras la administración de más de 25.000 dosis en los últimos 8 años, no se ha producido ningún caso de tétanos en los équidos inmunizados.

La nueva cepa de *Clostridium tetani* (cepa G-94) aislada del suelo, se encuentra disponible en el Centro Militar de Veterinaria (figura 6) para fines de estudio e inmunización y ha quedado depositada en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) con el número 4629, donde anteriormente no había representación de cepas tetánicas aisladas en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Piédrola Gil G, Domínguez Carmona M, Cortina Greus P, Gálvez Vargas R, Sierra López A, Sáenz González MC, et al. Medicina preventiva y salud pública. 8ª ed. Barcelona: Salvat, 1988;525-528.
2. Ramón G. La vaccination antitetanique au moyen de l'anatoxine spécifique. Rev d'Immunol 1935;1(1):59-65.
3. Nicoletti G, Mar Nicolosi V. Diccionario de bacteriología humana. Centro de documentación científica Menarini, 1989;55-56.
4. Katitch RV. Les maladies des animaux domestiques causées par les microbes anaérobies. Paris: Ed. Vigot Freres, 1965;36-64.
5. Hutyra F von, Marek J, Manninger R, Mócsy J. Patología y terapéutica especiales de los animales domésticos. Tomo 1. Barcelona: Ed. Labor, 1973;559-577.
6. Bruner DW, Gillespie JH. Hagan's Infectious diseases of domestic animals. Sixth edition. Ithaca: Cornell University Press, 1973;360-368.
7. Frobisher M. Microbiología. Barcelona: Salvat Editores, 1969;488.
8. Turpin A, Raynaud M, Rouyer M. Purification de la toxine et de l'anatoxine tétaniques. Ann Inst Pasteur 1952;82:299.
9. Turpin A, Raynaud M. La toxine tétanique. Ann Inst Pasteur 1959;97:718.
10. Prévot AR. Techniques pour le diagnostic des bactéries anaérobies. 2ª ed. Paris: Éditions de la Tourelle, 1966;91-100.
11. Ramón G. La production des toxines diphtérique, tétanique, staphylococcique en vue de l'obtention des anatoxines correspondantes. Techniques-résultats. Rev d'Immunol 1939;5(5):386-401.
12. Álvarez MV, Boquet E, de Fez I. Manual de técnicas en microbiología clínica. Madrid: Publicaciones AEFA, 1990;87-107.
13. Cottral GE. Manual de métodos estandarizados en microbiología veterinaria. Mexico: La Prensa Médica Mexicana, 1986;453-454.
14. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol.II. Baltimore: Williams and Wilkins Company, 1986;1195-1196.
15. Merchant IA, Packer RA. Bacteriología y virología veterinarias. Zaragoza: Ed. Acribia, 1975;425-429.
16. Ramon G. L'immunité conférée par l'anatoxine tétanique chez l'homme et chez le cheval. Rev d'Immunol 1939;5(6):478-486.

INSTITUTO DE ESPAÑA Y REAL ACADEMIA DE MEDICINA Y CIRUGÍA DE GALICIA CONVOCATORIA DE PREMIOS PARA EL CURSO 1996

Premio "Barrié de la Maza, Conde de Fenosa".- Dotado con 500.000 pesetas y título de académico correspondiente sobre tema libre.

Premios de la Fundación "Caixa Galicia-Claudio San Martín".- Un premio de 250.000 pesetas y título de académico corresponsal, a un trabajo sobre estudios médico-geográficos de un área de Galicia que trate de aspectos socio-sanitarios de un territorio comarcal o local de la Comunidad Gallega.

Dos premios de 125.000 pesetas cada uno y título de académico corresponsal para los dos mejores expedientes presentados de Licenciatura de Medicina, Farmacia o Biológicas de alumnos que hayan terminado sus estudios en la convocatoria de 1996 en las Universidades de Galicia.

Los interesados podrán solicitar **información** sobre las bases y condiciones a la Secretaría de la Real Academia, C/ Durán Loriga, 10-2º, 15003 La Coruña. Teléfono (981) 22 49 40; Fax (981) 22 54 52.