Klebsiella sp. incert. aislada de ratas grises

por Enrique Savino y Néstor Morales Villazón

Este relato contiene las observaciones relacionadas con el estudio de dos cepas de *Klebsiella* aisladas de ratas grises. El interés del hallazgo radica, en parte, en la semejanza tintorial que tienen estas bacterias con la *Pasteurella pestis*.

I. ANTECEDENTES

Las bacterias del género *Klebsiella* han sido aisladas de diversas muestras de materiales de origen humano y animal, como también del aire, agua, polvo suelo, etc. (Bamforth 1928; Edwards, 1929; Hay, 1932; Julianelle, 1930 y 1937 y Ostermann y Rettger, 1941).

II. MATERIAL Y MÉTODO

1. *Material*: Consistió en el bazo de las ratas grises que son remitidas al Pabellón Pasteur del Instituto Bacteriológico "Dr. Carlos G. Malbrán" con el objeto de la fiscalización de la peste en nuestro país.

2. *Método*. a): Examen bacterioscópico del bazo de la rata gris, previa fijación de la impresión del citado órgano mediante la mezcla de alcohol y éter —en partes iguales— con bicloruro de mercurio al 0,1 %. Una vez fijado el material, lavamos con agua y teñimos con una solución hidroalcohólica de azul de metileno. b). Inoculación al cavia de la suspensión, en solución salina, del bazo del roedor o de los desarrollos de las bacterias capsuladas. c). Siembra, en agar nutritivo, del material de bazo, médula ósea y de sangre obtenida por punción cardíaca de las cavias muertas por inoculación de los materiales arriba citados. d). Estudio de los caracteres culturales de las cepas aisladas de acuerdo a la técnica ya descrita (Savino, Aldao y Anchezar, 1939).

Presentado en la reunión de comunicaciones del 18 de setiembre de 1945.

III. RESULTADOS

Mediante el método descrito, en el párrafo anterior, aislamos dos cepas de bacterias capsuladas que denominamos 892 y 940. La primera cepa proviene de una rata gris cazada, el 15 de septiembre de 1942, en el Elevador Dock Sud del puerto de Buenos Aires. El origen de la segunda cepa fué también, de una rata gris, atrapada el 23 de noviembre de 1942, en el Elevador del dique 2 (puerto de Buenos Aires).

El examen bacterioscópico del bazo de los roedores citados, demostró la existencia de bacterias de coloración bipolar, semejante a la *Pasteurella pestis*. Sin embargo, otros microorganismos aparecían rodeados de una cápsula.

La inoculación al cavia de la suspensión de los citados bazos provocó la muerte de los animales en 24 horas. Los cavias presentaron el signo de Straus y congestión generalizada de sus vísceras. Además, el examen bacterioscópico del hígado, bazo y de los exudados peritoneales, pericárdicos y de la vaginal del testículo, demostró la existencia de numerosas bacterias capsuladas (fot. 1). En cambio, si las impresiones de los materiales citados eran fijadas por el calor, y luego teñidas con azul de metileno, las bacterias presentaban coloración bipolar, semejante a la *P. pestis* (fot. 2).

1. *Caracteres biológicos de las cepas aisladas.* a) *Cavia.* La inoculación al cavia de una suspensión, en caldo nutritivo, de un desarrollo (cepas 892 ó 940) de 24 horas de incubación a 29-30° C, provoca temperatura, fenómeno de Straus (fot. 3) y muerte de los animales según lo indica el gráfico 1.

En el gráfico 1 tenemos los resultados obtenidos de la inoculación al cavia de 1 ml., de diluciones, en caldo nutritivo, de una suspensión de 5.000 millones de bacterias por ml. Este último material fué obtenido por desarrollo de las bacterias en agar nutritivo, a 29-30° C, durante 24 horas de incubación.

Un grupo de animales fué inoculado por vía intraperitoneal y otro por vía subcutánea. Los cavias eran examinados diariamente y registrábamos la temperatura rectal, reacción local y el fenómeno de Straus.

El gráfico 1 indica que los animales inoculados por vía intraperitoneal mueren en un tiempo más corto que los infectados por vía subcutánea. Además, los animales inoculados por vía intraperitoneal o subcutánea presentaron el fenómeno de Straus y temperatura superior a 40° C.

También los cavias infectados por vía subcutánea presentaron en la región inoculada un edema blando, gelatinoso, que desapareció después de varios días. Además, la inoculación de los animales por vía intraperitoneal o subcutánea provocó la formación de un exudado de aspecto gomoso en las cavidades peritoneal, pericárdica y vaginal del testículo. Como hemos dicho anteriormente, los citados exudados contenían abundantes bacterias capsuladas (fot. 2).

Además del examen bacterioscópico, los cultivos de hígado, bazo, sangre de punción cardíaca y de médula ósea, de los cavias inoculados —por vía subcutánea o intraperitoneal— dieron resultados positivos para las cepas capsuladas estudiadas.

b) *Ratón blanco.* La inoculación intraperitoneal de 20 a 32 bacterias suspendidas en caldo nutritivo, provocó la muerte de los animales en 3 a 4 días. Además, los animales inoculados presentaron numerosas bacterias capsulares en el exudado contenido en la vaginal del testículo (fot. 4) y en la cavidad peritoneal. Los ratones blancos, machos también, manifestaron el fenómeno de Straus.

c). *Conejo.* Es un animal resistente a las citadas bacterias capsuladas. La inoculación intravenosa de 1 ml. de la dilución 10^{-2} de un cultivo de 24 horas en caldo nutritivo no provocó reacción alguna en el conejo.

IV. CARACTERES CULTURALES Y FISIOLÓGICOS

Es un microorganismo de fácil y abundante desarrollo en los medios nutritivos comunes. El crecimiento en superficie en agar nutritivo permite el reconocimiento de los tipos de colonias siguientes: mucosas (M), lisas (L) y mixtas (ML).

Las colonias denominadas M (fot. 5) tienen consistencia mucosa y color blanco grisáseo; son ligeramente opacas, de bordes lisos, superficie lisa y brillante. Las colonias L (fot. 6) son transparentes de color azul claro, de bordes lisos y superficie lisa y brillante. Las colonias ML presentan caracteres comunes a las colonias M y a las L (fot. 7).

Las colonias M están formadas por bacterias capsuladas y virulentas. En cambio, los microorganismos de las colonias L han perdido su cápsula y virulencia. Así, la inoculación al ratón blanco de bacterias de las colonias M, provoca la muerte del animal a la dosis de 1 ml de la dilución 10^{-6}, en caldo nutritivo, partiendo de una suspensión de 5.000 millones de bacterias por ml. Sin embargo, los microorganismos pertenecientes a la colonia L no son virulentos para el ratón blanco, aun en la dilución 10^{-2}.

La tabla 1 contiene el resultado del estudio de los caracteres fisiológicos de las cepas 892 y 940.

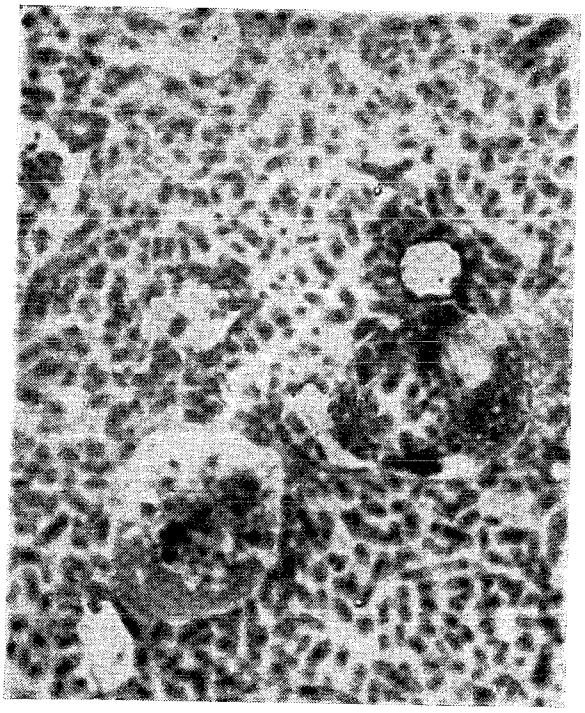
El examen de la tabla 1 permite extraer las conclusiones siguientes: 1) ciertos hidratos de carbono son fermentados rápidamente con formación de ácido y gas; ejem.: glucosa, maltosa, lactosa, manosa, glicerina e inosita.

La reacción permanece ácida, aun después de haber fermentado los citados hidratos de carbono y transcurriendo 20 días de incubación. En cambio, con otros hidratos de carbono, hay también producción de ácido y gas, pero, después de 3 a 20 días, el medio nutritivo se alcaliniza y el pH llega a 7,8-8,4. Tal ocurre con los hidratos de carbono siguientes: galactosa, salicina,, almidón, ramnosa, sacarosa, levulosa, aabinosa, celulosa, adonita, sorbita, trealosa, dex-

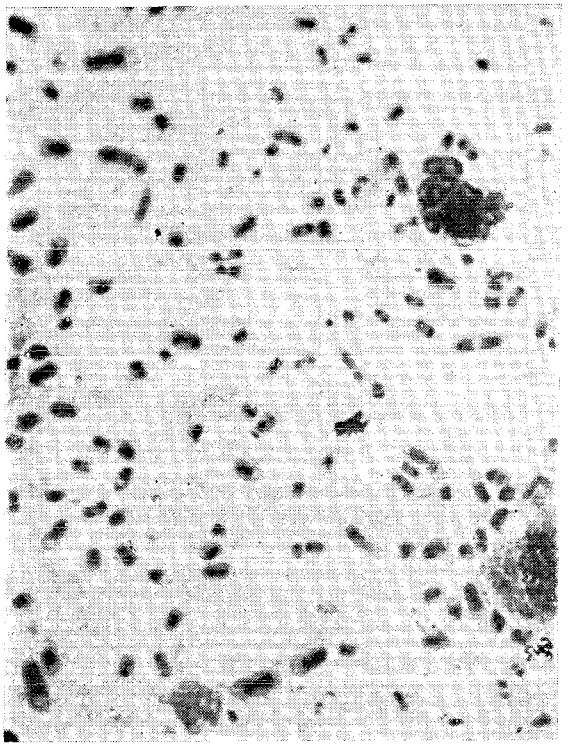
TABLA 1

CARACTERS CULTURALES Y FISIOLÓGICOS DE LAS CEPAS 892 Y 940.

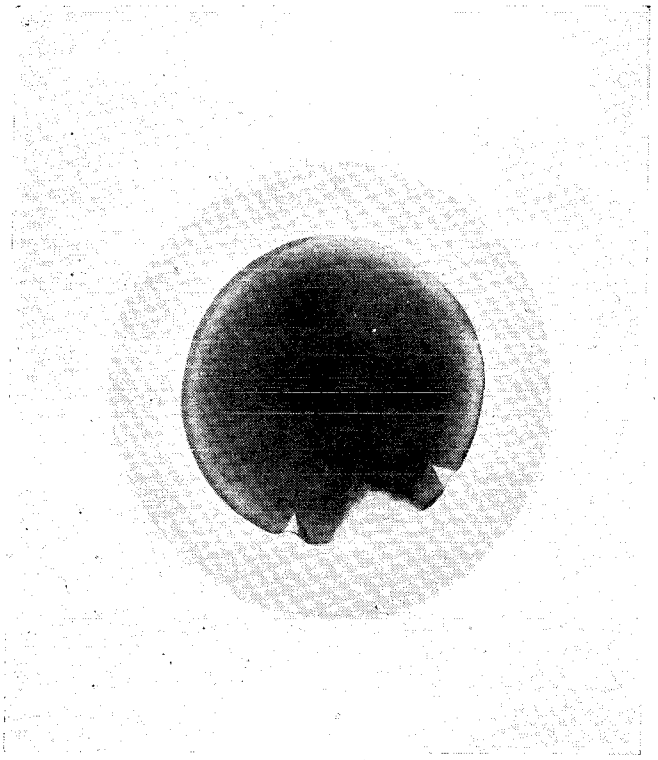
Movilidad	Negativa
Catalasa	Positiva
Reducción de azul de metileno	Positiva
Leche tornasolada	Decolora, acidifica y coagula al 3er. día. Luego peptoniza
Reacción de Voges-Proskauser	Negativa
Reacción del rojo de metilo	Positiva débil
Formación de H_2S	Positiva
Indol	Negativa
Formación de NH_3	Positiva
Reducción de nitrato	Positiva
Gelatina	No licúa
Papas glicerinadas	Abundante desarrollo con formación de gas
Koser	Positivo
Mac Conkey	Formación de ácido y gas (A. G.)
Agar sangre	No hay hemólisis
Maltosa	AG.
Galactosa	AG y luego alcaliniza
Inulina	Alcaliniza
Salicina	AG y luego alcaliniza
Lactosa	AG
Almidón	AG y luego alcaliniza
Ramnosa	AG y luego alcaliniza
Sacarosa	AG y luego alcaliniza
Glucosa	AG
Levulosa	AG y luego alcaliniza
Arabinosa	AG y luego alcaliniza
Celulosa	AG y luego alcaliniza
Manosa	AG
Adonita	AG y luego alcaliniza
Sorbita	AG y luego alcaliniza
Trealosa	AG y luego alcaliniza
Eritrita	Alcaliniza
Dulcita	Alcaliniza
Melecitosa	Alcaliniza
Dextrina	AG y luego alcaliniza
Arabitol	Alcaliniza
Manita	AG y luego alcaliniza
Rafinosa	AG y luego alcaliniza
Glicerina	AG
Inosita	AG



Fot. 1. — Exudado testicular de un cavia, inoculado con la cepa 940, con numerosas bacterias capsuladas. Aumento 1500 x.



Fot. 4. — Impresión del bazo de un ratón blanco, inoculado con la cepa 940. Aumento 1.500 x.



Fot. 7. — Colonia mixta (ML). Aumento 25x.

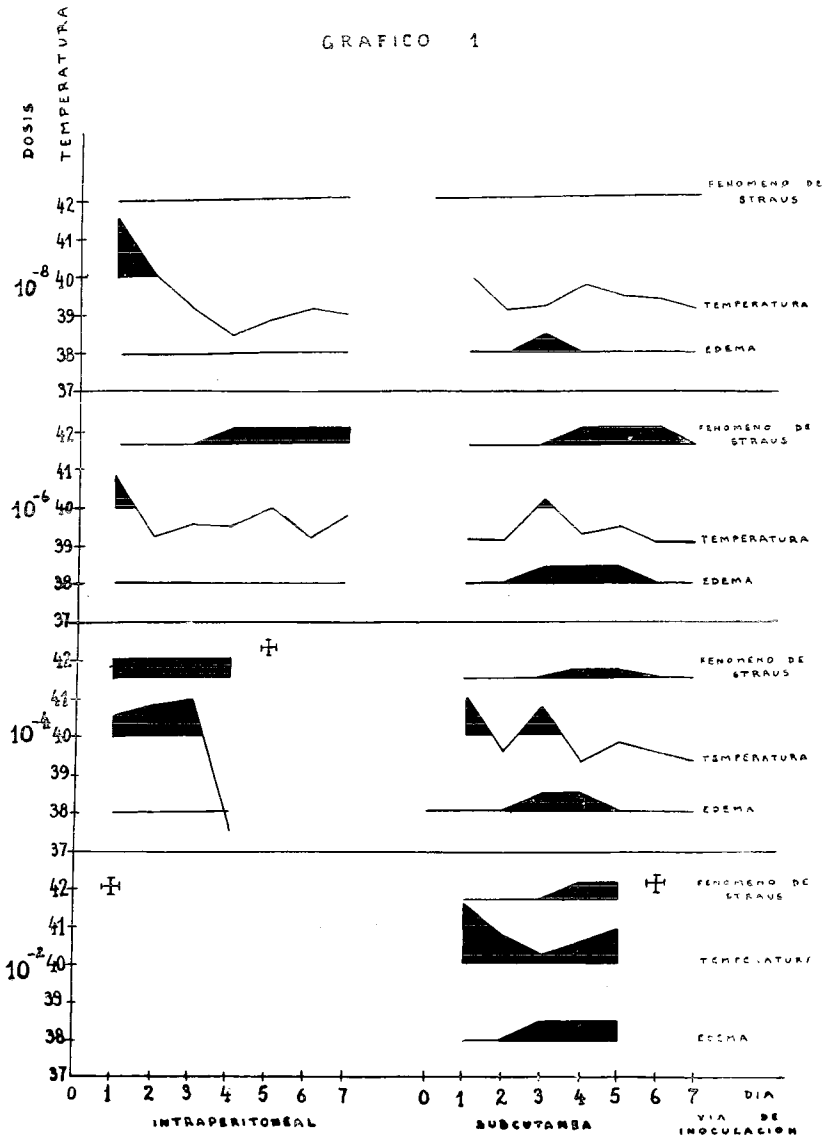
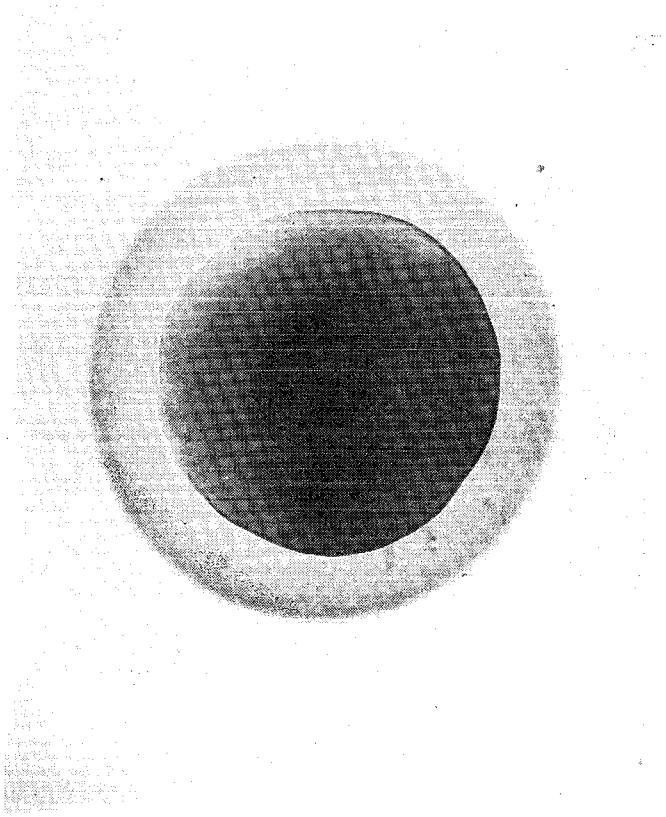
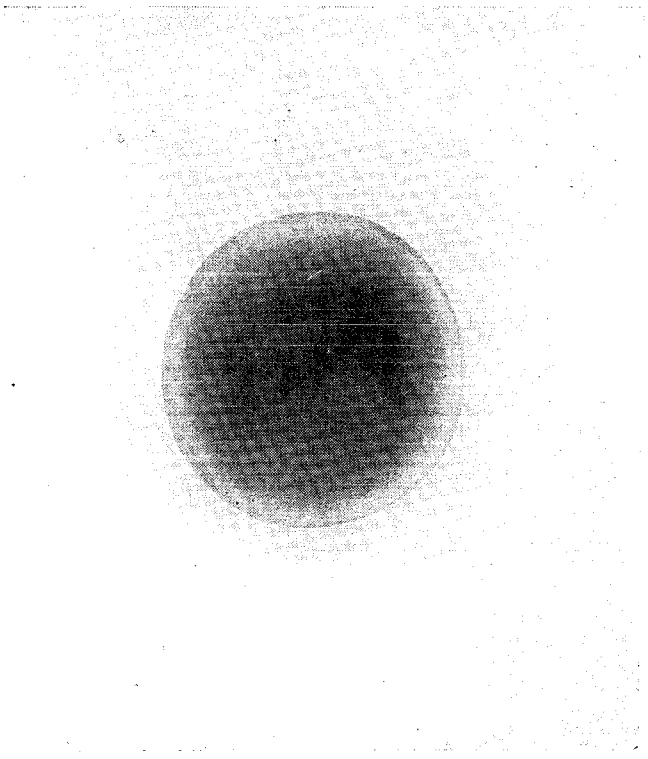


GRAFICO 1
DOSIS
TEMPERATURA
10^{-8}
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
42
41
40
39
38
37
FENOMENO DE STRAUS
TEMPERATURA
EDEMA
0 1 2 3 4 5 6 7
DIA
INTRAPERITONEAL
SUBCUTANEA
VIA DE INOCULACION



Fot. 5. — Colonia micosa (M). Aumento 25x.



Fot. 6. — Colonia lisa (L). Aumento 25x.

El 22 de noviembre se interna en el Hospital Muñiz (Inst. Penna) la enferma M. A. P., de 28 años, soltera, boliviana, enfermera, cuya historia clínica referimos con más detalles por ser la enferma que atendida por uno de nosotros permitió realizar un estudio clínico más completo.

Antecedentes de la enfermedad actual. — Comienza el día 16 del corriente por la mañana con cefalea de poca intensidad, edema palpebral bilateral y escasa fiebre, 37°2R; ella misma se medicó, vacuna antigripal y veramón, el día 17 estuvo perfectamente bien, quedando únicamente con astenia e inapetencia hasta el día 19; durante todo este tiempo continúo desempeñando sus tareas habituales El día 20 por la mañana acusó discreto dolor de cabeza, quebrantamiento general, raquialgia, poca fiebre y movió el vientre cuatro veces espontáneamente: trabajó hasta las 12 hs. A medio día tuvo vómitos biliosos precedidos de estado nauseoso, un violento escalofrío con castañeteo de dientes, la temperatura llegó a 39°, tuvo una profusa sudoración, acusó un intensísimo dolor de cabeza, difuso, acompañado de mareos; más tarde manifiesta tener imposibilidad por la marcha y a las 18 horas, "perdió el movimiento", hasta las 9 hs. del día 21; se despertó toda dolorida y con cefalea y fiebre. A medio día volvió a "perder el movimiento": fué medicada con sulfamida por vía bucal, el día 22 amaneció "bastante bien" persistía la cefalea y el decaimiento general.

Antecedentes de medio. — Trabaja en un laboratorio particular, y actualmente una compañera de ella se enferma aparentemente de lo mismo y casi al mismo tiempo.

Estado actual. — 23 de noviembre de 1944. Enferma lúcida, sub-febril, 37°2R, buen estado general y de nutrición, decúbito activo facultativo, huesos y articulaciones libre e indoloras, músculos tónicos y tróficos, masas musculares dolorosas, regular cantidad de tejido célulo-adiposo subcutáneo bien distribuído, piel blanca elástica, normotérmica al tacto, Hiperestesia cutánea.

Cabeza: Cráneo y cara: nada de particular; ojos: *conjuntivas congestionadas,* pupilas céntricas, iguales, redondas, regulares, reaccionan a la luz y acomodación.

Nariz y oídos: Nada de particular.

Boca: Labios húmedos, faltan numerosas piezas dentarias, lengua húmeda, móvil, discreta saburra.

Istmo de las fauces: *Discreta congestión de pilares anteriores,* amígdalas aumentadas de tamaño, *congestionadas.*

Cuello: Nada de particular.

Corazón: Doble tono en todos los focos, pulso regular, igual mediana tensión y amplitud, 70 pulsaciones por minuto.

Pulmones: Se ausculta murmullo vesicular normal, sin ruidos agregados, tiene escasa tos seca.

Abdomen: Depresible, indoloro, móvil.

Hígado: Borde inferior se palpa a dos traveses de dedo del reborde, blanco, indoloro, de forma conservada.

Bazo: Se palpa polo inferior *doloroso* a dos traveses de dedo del reborde, blando, de forma conservada.

Sistema nervioso: Se constata una *hiperreflexia* tendinosa y cutánea, nistagmus y discreta paresis de miembros inferiores.

24 de *Noviembre* —1944—: Persisten las manifestaciones congestivas de las conjuntivas del istmo de las fauces, ha desaparecido la tos, la palpitación del brazo es indolora, hepatomegalia e hiperreflexia sin variación. Discreta cefalea sub-febril.

27 *de Noviembre*: Sin variación.

28 *de Noviembre*: Persiste el nistagmus y la hiperreflexia tendinosa así como la hepato y esplenomegalia; han desaparecido la cefalea, apirexia, marcha casi normal. Alta a su pedido.

Análisis de sangre: 23 de Nov. de 944. Glucosa: 0,83. Urea 0,25.

Céfalo raquídeo: Albúmina: 0,25, Globulina R. de N. Appelt: negativo, R. de Pandy: negativo, Glucosa: 0,55, Cloruros: 7,40. linfocitos 100 %.

1. *Examen bacteriológico*: Negativo.

Análisis de sangre: (24 de Nov. 944) hematíes. 4.800.000; leucocitos 11.200; Eosinófilos: 1; Lobulados: 7; Segmentados 61; Linfocitos 20; Monocitos 9; C. de Turck 2.

Eritrosedimentación: 1 hora: 2

Hemocultivo: Negativo, (27 de Nov. 944).

Análisis de sangre: Wasserman: negativo; Kahn: negativo; presuntiva: negativo. (28 de Nov. 944).

Conjuntamente con esta paciente, cae afectado el Dr. M. A. R. el día 16 del mismo mes. Por la mañana concurre al Instituto Bacteriológico, pero por la tarde se siente "engripado", febril y mareado, se dirige a su domicilio y consulta a un médico, quien comprueba fiebre, estado soporoso, inapetencia y dolor en la nuca (más bien la sensación de adormecimiento molesto como si tuviera un sombrero calzado muy profundamente). Continúa con el mismo cuadro y fiebre de 39° durante 2 días. Se medica con sellos antigripales, se queda a dieta durante 2 días, mejora con estos remedios y a los 7 días vuelve al Instituto con marcada astenia, que dura 3 semanas. No podía leer más de dos páginas, pues se fatigaba.

El último caso corrsponde al Dr. A. C. S. que trabajó en el aislamiento del virus de la enferma M. A. P. El día 3 de diciembre por la noche siente algunos escalofríos y discreto decaimiento. Estos se hicieron más intensos al día siguiente, en que siente cefaleas y dolores en tronco y piernas. Conserva su lucidez, tiene apetito y fuera de la discreta astenia se siente perfectamente bien. La hipertermia de 39° desaparece a las 48 horas y tiene una mejoría completa a los 10 días, sintiendo profunda astenia en el intervalo.

Las observaciones señaladas por nosotros han tenido como característica primordial una evolución sintomática de mediana o poca intensidad.

Los casos fueron de comienzo agudo y obligaron a guardar cama a todos los pacientes, menos a G. y B. R., que solamente padecieron de una "gripe" con discreta astenia y que mejoró tomando antipirético.

El paciente Dr. C. B., es atacado con mayor intensidad; padece un proceso "gripal" con estado nauseoso, violento escalofrío y astenia, este estado dura 3 días, hay un período de apirexia de 2 días con un nuevo repunte con hipertermia y cefalea considerable. Este tipo sugiere la posibilidad de la existencia de encefalitis o encefalomielitis a doble onda, no similar a la "V gripal" sino con un período de apirexia mayor, pues en nuestro caso el tiempo transcurrido con mejoramiento acentuado de los síntomas fué de 48 horas y en los casos 7 y 8 de Lennette y Koprowski hubo un período en el 1º de 24 horas y en el 2º de 3 días.

La presunción diagnóstica de "grippe" en nuestros pacientes no pudo desecharse en los primeros momentos, dada la sintomatología similar de todos los enfermos con excepción de M. A. P., que comentamos aparte y que fué la más intensamente atacada. Sin embargo el cuadro clínico no corresponde enteramente a la "grippe" porque si bien las cefaleas, la astenia, los dolores generalizados, le pertenecen, faltan en cambio las localizaciones del aparato respiratorio. Unicamente tienen de común una angina roja con discreta congestión de pilares y las conjuntivas congestionadas.

Debemos destacar netamente la existencia en la mayor parte de ellos de cefalea violenta, algias difusas, mialgias intensas, lumbalgia y en un caso hiperestesia cutánea. El aparato digestivo fué tomado con cierta intensidad, el estadó nauseoso predominó, pero en un caso se llegó al vómito bilioso y a una discreta diarrea.

Las alteraciones del sensorio sólo fueron intensas en la paciente M. A. P., quien durante 24 horas durmió profundamente sin acordarse de nada y al despertar notó que no podía mover las piernas y ambular.

Si comparamos el brote de encefalomielitis venezolana, estudiado por nosotros, con los estudiados por Casals, Curnen y Thomas y Lennette y Koprowski, podemos notar que en el aspecto sintomático se parecen mucho y si bien los primeros autores refieren 2 casos de mediana intensidad y breve duración los 8 casos de los autores referidos en 2º término, permiten comprobar la existencia de formas clínicas medianas y severas, tres como los números 1, 5, y 8.

En nuestros pacientes dividiéndolas desde este punto de vista, podemos decir que de los 8 enfermos estudiados, los casos de breve duración y de poca intensidad fueron 6, en uno hubo una evolución en doble onda que ya hemos comentado, y en el penúltimo, la sintomatología fué alarmante durante 48 horas, pues la enferma tenía un sueño profundo, pérdida de los movimientos de los miembros inferiores, cefalea violenta, hipertermia y delirio.

La visión panorámica de los enfermos que han padecido la encefalomielitis venezolana, hace que debamos consignar en primer término 2 hechos fundamentales: el polimorfismo sintomático y la dificultad diagnóstica. El polimorfismo sintomático es evidente: por los datos clínicos y de laboratorio comunes, no es posible establecer la etiología del proceso. Sólo el antecedente de medio unido al cuadro clínico, permite realizar el diagnóstico que puede ser confirmado por las investigaciones especiales que dentro de un momento detallaremos. Conviene todavía recordar que la encefalomielitis venezolana puede dar formas clínicas de mediana intensidad y de breve duración, con cuadro sintomático de infección generalizada y que dan lugar a una respuesta inmunitaria en el paciente, exactamente igual a las otras formas mucho más severas. Este aspecto de la cuestión señalado por Casals, Curnen y Thomas sugieren una serie de observaciones interesantes sobre el aspecto inmunológico y epidemiológico, no sólo de la enfermedad que estamos tratando, sino de otros procesos a virus que afectan el sistema nervioso.

Las 8 observaciones comentadas por nosotros, fueron estudiadas, 4 desde el punto de vista clínico exclusivamente, sin que se hicieran las investigaciones pertinentes por causas ajenas a nuestra voluntad. En otros 4 pacientes, se comprobó la infección, en 2 por las pruebas de neutralización del virus y en otros 2 por el hallazgo directo del germen. Si catalogamos a todos los pacientes como afectados de un mismo proceso, es por el hecho de que trabajaban en el mismo laboratorio y en las mismas tareas, enfermaron conjuntamente, el cuadro clínico fué similar y finalmente el antecedente de medio nos permitió englobarlos como tales.

MATERIAL Y MÉTODO

a) *Aislamiento del virus.* — Se inocularon ratones blancos por vía cerebral con suero de los enfermos en período agudo de la enfermedad. El primer pasaje se efectúo a los primeros síntomas de enfermedad presentados por estos animales (temblores, pelo erizado, encorvamiento). Los demás se hacían cuando estaban muy enfermos.

El virus se conservó a -76° C durante los experimentos.

b) *Prueba de neutralización.* — Los sueros de dos de los enfermos se obtuvieron durante el período agudo y durante el período de convalecencia. En los otros dos solamente se tuvo suero durante el período de convalecencia. Las pruebas de neutralización se efectuaron mezclando cantidades iguales de suero sin diluir con diluciones variadas del virus. Se inocularon cada una de las mezclas, sin incubación previa, a grupos de cuatro ratones blancos. Los animales tenían aproximadamente 30 días de edad y la dosis por ratón fué de 0,05 cc. por vía peritoneal.

Las muertes se registraron durante 15 días.