

REVISTA
DEL
INSTITUTO BACTERIOLOGICO
DEL
DEPARTAMENTO NACIONAL DE HIGIENE

Técnica para el aislamiento del virus
de la psitacosis

Por A. SORDELLI y J. A. ZUCCARINI

(Con una lámina)

El diagnóstico de la Psitacosis típica, tiene por lo general suficiente base de datos clínicos para hacer innecesario el empleo de otros métodos, tales como los que ofrece el laboratorio por el aislamiento del virus o por la fijación del complemento.

Pero a pesar de ello es siempre conveniente disponer de métodos exactos que permitan afirmar de manera inequívoca la existencia de una infección por el virus de la Psitacosis para determinar la verdadera difusión de la infección, y para los casos en que existe la duda del diagnóstico diferencial entre una infección respiratoria producida por otros virus y la Psitacosis.

En la literatura argentina de los últimos tiempos aparecen descritos dos brotes, cuyo diagnóstico ha sido establecido con la sola base de los datos clínicos y sin que mediara en uno de ellos la sugestión, siempre tan propicia, de un loro enfermo entre los antecedentes.

El Instituto Bacteriológico ha intervenido en estas dos circunstancias, y otras más no publicadas, prestando el auxilio de sus labora-

Recibido para publicación en Agosto de 1939

1939 XXIX 1939-11-14

torios, el del consejo de sus técnicos y haciendo que el Profesor Bedson, del London Hospital, diera la confirmación del diagnóstico por el hallazgo de anticuerpos de fijación en el suero de los convalecientes. Faltaba sin embargo, la prueba decisiva, obtenida siquiera para uno de los enfermos de un brote, del hallazgo del virus. Demás está decir que las tentativas del aislamiento fueron realizadas toda vez que un enfermo sospechoso emitía un esputo. Las circunstancias que hacen a este hallazgo relativamente poco frecuente son: a) que la expectoración es muy escasa en la Psitacosis; b) que ella se hace presente a veces muy tarde en la enfermedad y el virus puede estar ausente; c) que los métodos del hallazgo del virus están disminuidos en su efectividad por la necesidad de separarlo de las bacterias que lo acompañan utilizando procedimientos que lo reducen en cantidad o lo destruyen.

A pesar de ello uno de nosotros (J. A. Zuccarini) ha podido aislar el virus del esputo de un enfermo siguiendo las normas clásicas, con alguna variante, hecho ya comunicado en la Reunión N° 108 del Personal del Instituto el 27 de diciembre de 1938. De este modo se tuvo la prueba de la existencia del virus de la Psitacosis en el esputo de un enfermo de un brote epidémico importante ocurrido en Bahía Blanca y clínicamente y epidemiológicamente análogo a otros antes acaecidos, con lo cual queda afianzado el diagnóstico etiológico de manera irrefutable.

El diagnóstico por aislamiento del virus tiene las siguientes características y limitaciones:

1) En las vísceras el hallazgo es una rareza pues seguramente la capacidad infectante está muy disminuída, cuando no ha desaparecido el virus, pues la muerte ocurre en general recién al promediar la tercera semana.

2) En la sangre no se le encuentra sinó rara vez en el comienzo y casi nunca en período de estado.

3) « El esputo, particularmente en el comienzo de la enfermedad, es el material que más probabilidad tiene de dar resultados positivos » (Laboratory diagnosis of Psittacosis, 1937) ⁽¹⁾. La transcripción que sigue del mismo trabajo da idea del método, de sus dificultades y de su inseguridad. (Ver también Rivers y Berry) ⁽²⁾. Después de hacer cultivos en placas de agar sangre, el esputo

⁽¹⁾ « Reports on Public Health and Medical Subjects » N° 80. Laboratory diagnosis of psittacosis. London 1937. H. M. S. O.

⁽²⁾ A. M. RIVERS and G. B. BERRY. « A laboratory method for the diagnosis of psittacosis in man » Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine 1932 XXIX pág. 942-44.

debe ser emulsionado en más o menos diez veces su volumen de caldo, agitando bien en un frasco cerrado con perlas de vidrio. La emulsión se inyecta entonces por vía peritoneal en por lo menos tres ratones en las cantidades de 0,25 a 0,5 ml. con la esperanza de que por lo menos uno pueda escapar a la infección casi inevitable concomitante con pneumococos y sobrevivir bastante tiempo para el desarrollo del virus. Se debe hacer además filtrados de la emulsión por arena y pulpa de papel y por bugía Berkefeld V o por membranas gradocol, los que deben ser inoculados intraperitonealmente en la cantidad de 1 a 2 ml. en varios ratones. Tal inoculación debe repetirse durante tres días consecutivos en tres ratones y este procedimiento es el que da más probabilidades de hallazgo de pequeñas cantidades de virus de la Psitacosis. Los ratones se mantienen en observación y además es aconsejable un pasaje más, con el bazo de uno o más de los ratones al fin de los diez días y de nuevo al fin de un mes.

Precisamente con los procedimientos de filtración antes descritos y aún de inoculación directa, se sucedieron los fracasos, y se obtuvo el éxito mencionado.

En el mes de diciembre del año pasado se presentó un caso de infección de laboratorio con sintomatología de la psitacosis, pero en el cual el diagnóstico clínico no fué aceptado por todos los médicos. Sospechada la infección por psitacosis desde los primeros días de la enfermedad se buscó el virus con más minuciosidad y como lo dice el relato que sigue:

CASO 1.

INVESTIGACIÓN DEL VIRUS EN LA SANGRE

En el tercer día de la enfermedad, con temperatura de 39°5, se tomó sangre citratada que se inyectó a ratones por vía peritoneal. Los animales no presentan signos. A los 15 días se hace una reinoculación de un ratón con el bazo de uno de los ratones inyectados con la sangre. En los preparados de bazo del ratón sacrificado no se observa la presencia de los corpúsculos de Lewinthal (L. L. C. bodies) (1).

(1) LEWINTHAL LILLIE y COLES descubrieron casi simultáneamente las inclusiones en el plasma de las células del SRE que son características de la psitacosis y que llevan también el nombre de corpúsculos de Lewinthal Lillie y Coles (en inglés L. L. C. bodies).

Los tres ratones sobrevivientes de la inoculación y el reinoculadado con el bazo del cuarto, son infectados a los 40 días con el virus aislado del esputo del mismo enfermo y sucumben en 5 días por el virus de la psitacosis.

Esta prueba demuestra que en los animales no existió siquiera una infección asintomática y por tanto que en la sangre no había virus capaz de infectar el ratón blanco.

INVESTIGACIÓN DEL VIRUS EN EL ESPUTO

a) *Por el método de la filtración.* — El séptimo día de la enfermedad se obtiene una pequeña cantidad de esputo que se congela y descongela rápidamente cinco veces, se muele con alundum y diluye 1/20 en caldo pH 7,6, centrifuga la mezcla a 2.000 vueltas durante 15' y el líquido sobrenadante se lo filtra por Chamberland L². El líquido se inocula a 4 ratones blancos por vía peritoneal y en cantidad de 1 cm³. Al día siguiente se recoje otra muestra de esputo y se trata de igual manera, es decir se congela y descongela, se muele con alundum y se centrifuga. Una parte del líquido se reserva para los experimentos que se describen más abajo. Los ratones inyectados el día antes son reinoculados con 1 cm³ de la mezcla de los filtrados y al día siguiente se repite otra vez la inoculación de 1 cm³ de la misma mezcla.

Transcurren doce días sin que aparezca ningún signo de enfermedad y con el bazo de un ratón sacrificado se hace un pasaje a otro por inoculación intraperitoneal. En los preparados del bazo no se observan corpúsculos de Lewinthal. Al cabo de 40 días de la primera inyección se infectan los ratones blancos con el virus aislado del mismo enfermo y los cuatro sucumben a la infección por psitacosis.

Este experimento negativo sólo nos permite negar la presencia del virus en los filtrados, pero no en el esputo, pues es bien sabido que la retención de las partículas por filtros cuyos poros son mucho más grandes que las partículas, es un fenómeno que ocurre con frecuencia.

Es decir, que la única conclusión que conviene deducir del experimento mencionado es que no se puede afirmar que exista el virus de la psitacosis en los esputos emitidos por el enfermo. Tal es en verdad lo único que debiera decirse en todos los casos en que la sensibilidad del método es pequeña y sobre todo cuando pueda

encontrar un tropiezo como el de la incertidumbre de la filtrabilidad.

Fueron estas consideraciones las que nos indujeron a ensayar el procedimiento que sigue en el cual se ha excluido el obstáculo de la filtración.

b) Por el nuevo método objeto de esta nota. — Rivers, Lewinthal y Bedson, aconsejan inyectar la emulsión de esputo sin filtrar, en algunos ratones, con la esperanza de que un ratón por lo menos escape a la infección concomitante con neumococos y sobreviva lo suficiente para el desarrollo del virus.

Esta alternativa, con poca posibilidad de éxito, añadida a la de filtración por membrana de colodio de dimensión de poros conocidas (Elford p. ej.) es una prueba más de la incertidumbre del procedimiento.

Una circunstancia afortunada hizo que uno de nosotros pudiera traer de Londres en noviembre 1938 la Piridin-benzene-sulfonamida (693 MB, hoy llamada Dagenan) que tiene la propiedad de impedir la propagación de la infección en los ratones blancos, producida por los neumococos y los estreptococos, lo que nos indujo inmediatamente a utilizarla para inhibir la infección piógena del ratón por las bacterias más agresivas y que precisamente se encuentran en el esputo.

Fué así que el día 27 de diciembre fué utilizado el MB 693 en suspensión aceitosa al 5 % para tratar de aislar el virus de la psitacosis del 2º esputo y precisamente de la misma emulsión que después de filtrada se inyectó a los ratones.

Cuatro ratones blancos de 20 gramos de peso, se inyectaron por vía subcutánea con 0,5 cm³ de una solución oleosa de Piridina-benzene-sulfonamida (MB 693) al 5 % (25 mg. de substancia activa) y una hora después se inyecta alrededor de 1 cm³ de la emulsión centrifugada del esputo; 6 horas más tarde se inyectan otros 25 mg., 8 horas más tarde otros 25 mg. y 24 horas después, la última inyección de 25 mg. más de Piridin-sulfonamida. Diez días más tarde enferman los cuatro ratones y el oncenno día muere uno. Con el bazo de los restantes, que se sacrifican, y de la muerta se inyectan cuatro ratones.

No es observa sin embargo ninguna inclusión típica en los preparados de bazo hechos por impresión.

Los ratones del primer pasaje enferman ya a los 2 días y con dos de ellos se hace un segundo pasaje.

Ni en los dos animales del primer pasaje, sacrificados el 21 día, ni en los dos restantes, que mueren al cuarto día, nos fué posible

demostrar con absoluta certeza que existían inclusiones en las células que se observan en los preparados del bazo, confeccionados por impresión. Los animales del segundo pasaje enferman a los dos días y se sacrifican para hacer un tercer pasaje.

La investigación de los corpúsculos de Lewinthal se llevó a cabo en preparados por impresión de bazo y del peritoneo-gastro-esplénico (1) de los animales del 2º pasaje obteniendo la confirmación esperada, de la naturaleza del proceso mórbido que mataba a los ratones.

Además, en ningún ratón muerto o sacrificado se pudo demostrar la presencia de bacterias por cultivo ni por examen bacterioscópico.

En verdad el hallazgo de los corpúsculos en este 2º pasaje se debió al hecho de haber mejorado la técnica de coloración y de examen, pero sobre todo a la búsqueda practicada en el peritoneo. Los preparados que muestran una gran cantidad de células del SRE, las revela muy alteradas con su protoplasma vacuolizado y poco teñido y un número crecido de ellos contiene los corpúsculos de la pitacosis. En cambio el bazo de los mismos ratones no reveló sinó formas atípicas que no pudieron ser diagnosticadas con certeza.

Este virus fué desecado en vacío y después de un tiempo de conservación reinyectado a ratones. En el momento actual se encuentra en su centésimo pasaje.

Los preparados que han servido para la ilustración fueron obtenidos con epiploon y coloreados por el método de Giemsa.

Contrasta en este caso la facilidad con que fué obtenida la infección de los ratones por el método de la inoculación del producto séptico y la quimioterapia simultánea, con los resultados negativos del método corrientemente empleado y descripto antes.

CASO 2

De un enfermo de un brote de psitacosis ocurrido en Castelar, Provincia de Buenos Aires, el Dr. Osmar T. Grassi envió en julio 7 de 1938, el esputo obtenido en el 10º día de su evolución. Este fué examinado solamente por la nueva técnica descripta más arriba; los detalles del experimento son los siguientes:

Se diluye el esputo aproximadamente al vigésimo, con una mezcla de 1 parte de caldo pH 7,4 y 3 partes de agua destilada. Se agita suavemente con municiones de acero durante media hora, y

luego se centrifuga durante 15' a 3.000 vueltas, luego durante 5' a 5.000. El líquido sobrenadante completamente claro y que contiene buen número de bacterias, como lo reveló el cultivo, se inyecta en la cantidad de 1 cm³ en el peritoneo de 6 ratones que dos horas antes habían recibido por vía subcutánea 125 mg. de Piridin-sulfonamida suspendidos en 0,5 cm³ de aceite. Al cabo de 5 horas de la infección se vuelve a inocular 50 mg. de MB 693 y la inyección se repite tres días consecutivos usando cada vez 125 mg. de Piridin-sulfonamida.

A los siete días, se hace un pasaje con el bazo de dos ratones a otros dos, por inoculación intraperitoneal e igual cosa se repite a los 10 días con otros dos animales; hasta ese momento ninguno presenta signos de enfermedad. Dos días después, es decir a los 12 de la inoculación, se ven los ratones algo enfermos y tres de ellos, inesperadamente mueren al siguiente día, es decir a los 13 días de la primera inyección. Los tres animales restantes están muy enfermos. Dos de ellos (uno inoculado con el material original y otro del pasaje del 7º día que llevaba por tanto seis de inoculado con la emulsión del bazo) se sacrifican, se hace un pasaje con la emulsión del bazo y se confeccionan preparados con el peritoneo-gastroesplénico, los cuales teñidos con Giemsa demuestran gran número de corpúsculos de Lewinthal tanto en el ratón de primera inoculación como en el de primer pasaje. No se observan bacterias y los medios sembrados con sangre y bazo quedan estériles.

En una 4ª inoculación (3er. pasaje) los animales enfermaron en 3 días; uno muere al 4º. De los 3 restantes, muy enfermos en el 4º día, se conservan trozos de bazo desecados en vacío.

Estos resultados fueron confirmados por los del tercer caso descrito a continuación.

Caso 3

Pocos días después de estudiar el 2º caso se sabe de la existencia de un brote de psitacosis en Bahía Blanca, hallado por el Dr. Marqueta, quien gentilmente manda a nuestro requerimiento esputo emitido al 10º día de la enfermedad. El material fué enviado sin precaución especial para su mejor conservación, y llegó a las 60 horas de emitido, y fué inyectado después de permanecer 12 horas en la temperatura de -14°. Se procedió de igual manera que la relatada en el 2º caso, con la diferencia que los ratones fueron inyectados con Piridin-sulfonamida dos veces el día de la inocula-

ción y una vez en cada uno de los días subsiguientes, y no los tres días subsiguientes como en el 2º caso, y además que la centrifugación fué de 20' a 2.000 vueltas.

Al 4º día de la inyección infectante se sacrifica un ratón, se inyecta la emulsión del bazo a otros ratones y se confecciona preparados con el peritoneo -gastro-esplénico. El examen microscópico revela una abundante infección de las células retículo-endoteliales con los corpúsculos típicos de la psitacosis.

Los animales inoculados con el esputo enferman al 9º día y mueren al oncenno día, los de primer pasaje enferman al 3er. día y mueren al 6º día. Se practica dos pasajes más y de los animales del último (3er. pasaje) se conserva el bazo por congelación y desecación al vacío.

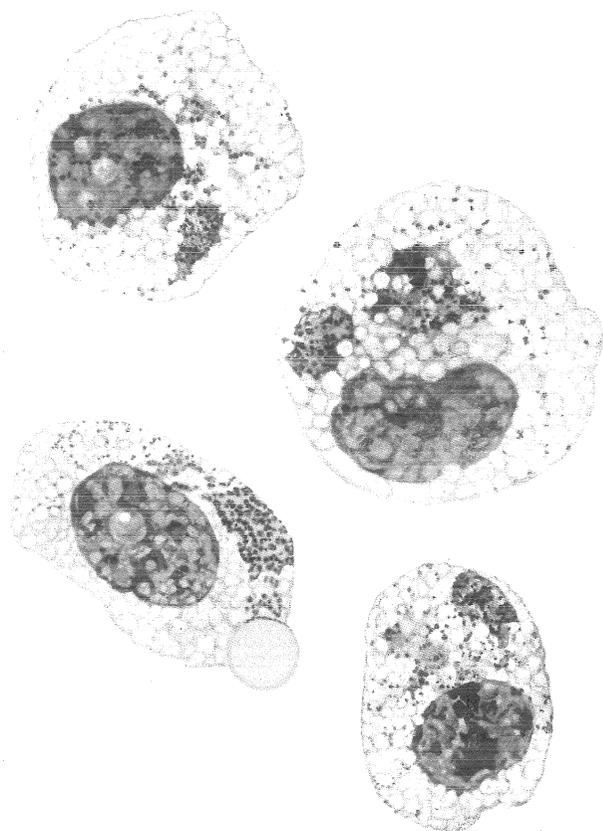
RESUMEN

El aislamiento del virus de la psitacosis del material contaminado por la flora respiratoria habitual exige una técnica relativamente complicada la cual no tiene gran probabilidad de dar resultados efectivos, cuando se recurre a los procedimientos usuales. La importancia de obtener un diagnóstico etiológico es tan evidente que apenas se requiere dar la prueba, y sobre todo si tal hallazgo se hace en el tiempo en que transcurre la enfermedad. Es cierto que desde el punto de vista práctico no se obtienen beneficios inmediatos puesto que ni el tratamiento ni las medidas de la interrupción del contagio variarán después de saber que el agente etiológico es o no el virus de la psitacosis. Pero si, tiene importancia cognoscitiva, y también práctica, para poder llegar a la mejor diferenciación por signos clínicos de un grupo de enfermedades respiratorias que obedecen a etiología variada y aun poco conocida, y de las cuales son agentes los virus llamados respiratorios. Por estas razones hemos juzgado interesante dar publicidad a los resultados obtenidos pues la aplicación del principio puede ser de utilidad para todo el grupo de tales virus respiratorios.

La técnica que nos parece conveniente para el caso de la psitacosis es la siguiente:

El esputo ⁽¹⁾ se diluye 20 veces con una mezcla de 3 partes de agua destilada y una parte de caldo de cultivo de pH 7,4. Se agita suavemente por 30' con municiones de acero y se centrifuga el líquido durante 25' a 2.000 vueltas con el objeto de hacer sedimentar

(1) En todos los casos el esputo estuvo congelado.



OC. 12 15 X, OBJ. 100 IMM, X 1500

AD NAT. P. JORGE BASTANIER, 1939
PALUMBO EXCUD.

Inclusiones Virus enfermo Dr. M. de 4º día inoculación esputo.
(tinción Giemsa)

las partículas más gruesas y parte de las bacterias. Se inyectan 8 ratones blancos de 20 grs. de peso con 120 mgs. de Piridin-sulfonamida en suspensión aceitosa al 25 % y dos horas después se inyecta por vía peritoneal 1 cm³ del líquido centrifugado. Seis horas más tarde, se inyectan 60 mgs. y 24 y 48 horas después 120 mgs. de Piridinamido-sulfonamida. El examen de la infección puede iniciarse a las 24 horas, haciendo preparados por impresión del peritoneo-gastro-esplénico, que son fijados por 20' en alcohol metílico y teñidos por 4 horas con Giemsa (1 cm³ en 50 de agua destilada) los que son lavados con acetona, con agua, luego con acetona y por último con agua. Se debe repetir el examen cada uno de los días subsiguientes con un ratón, haciendo cada vez un pasaje de bazo a otro ratón. El examen se completa por la observación de los ratones por el tiempo que indica la literatura y por la prueba de la resistencia por premunición, cuando no aparezcan las inclusiones características del virus.

CONCLUSIÓN

Se describe un método de investigación del virus de la psitacosis, en la expectoración, que une a su sencillez una mayor sensibilidad que los procedimientos usuales.