

## El espiroquete ictero hemorrágico en las ratas de Buenos Aires

Por EDMEE CHIODI

Motiva esta comunicación el deseo de hacer conocer la existencia del espiroquete ictero-hemorrágico en las ratas de Buenos Aires.

Las primeras investigaciones realizadas en los murinos con este objeto fueron hechas por el Dr. URIARTE. Posteriormente análogas investigaciones fueron hechas por los Dres. SPADA y MORALES VILLAZÓN.

Hace un tiempo los Dres. GRAPLOLO y PALAZZO comprobaron un caso de espiroquetosis humana en un enfermo procedente de Rufino.

Por haberse producido a mediados del año pasado un caso clínicamente sospechoso de espiroquetosis, el Dr. SORDELLI nos insinuó la conveniencia de reanudar la búsqueda comenzada por los Dres. URIARTE y MORALES y en esta forma se comenzó la investigación bajo la dirección del Dr. URIARTE. Y es así que después de numerosas y sucesivas inoculaciones practicadas en las cobayas con el triturado de las vísceras de las ratas que con otros fines llegan a la sección peste de este Instituto, pudimos encontrar en algunos de los animales en experiencia el microorganismo productor de la espiroquetosis ictero-hemorrágica en el hombre.

Como este trabajo será motivo más adelante de una publicación detallada resumiremos lo que hemos hecho hasta ahora. Para la búsqueda del espiroquete procedimos en la forma siguiente: pequeños trozos de hígado, riñón y cápsula suprarrenal de varias ratas previa trituración en solución fisiológica se inyectaron por vía subcutánea a una cobaya, inoculándose así cada vez varios de estos animales. Si alguno de los animales inoculados moría después del tercer día de ser inyectados se le practicaba la autopsia con el objeto de comprobar las lesiones. Durante más de siete meses se procedió de esta manera hasta que el 27 de abril del año en curso, dos de las cobayas en ensayo murieron presentando como único síntoma externo una pequeña hemorragia nasal, sin el menor vestigio de ictericia. En la necropsia se observaron diversas hemorragias bien aparantes en los órganos viscerales y en la superficie interna de la piel. Sospechando que estas lesiones pudieran ser causadas por el espiroquete se hicieron nuevas inoculaciones con dichos órganos y frotos de los mismos, éstos coloreados por el método de GIEMSA mostraron escasos espiroquetes. Los nuevos

*tuberculosis* — coloración que se efectúa con más lentitud que la de las bacterias no ácido-resistentes — la acción del ácido se manifiesta por una total impregnación del bacilo, puesto que desaparece el color rojo que el colorante ha conferido a los gérmenes, lo cual indica que la fucsina se halla en solución ácida y, consecuentemente, debe admitirse que el ácido penetra en el interior del cuerpo bacilar.

Resumiendo el problema se plantea con los hechos siguientes:

El ácido penetra en el bacilo coloreado.

El complejo ácido-colorante, que se forma dentro de la bacteria, no se disuelve en el ácido.

La posterior extracción del ácido, por medio de solventes cuales el agua o el alcohol, hace reaparecer el color rojo adquirido en un primer tiempo por las bacterias.

La interpretación del mecanismo de la ácido-resistencia se vuelve entonces una cuestión muy simple, sin dejar de reconocer que las hipótesis puedan variar en detalles de mayor o menor importancia.

Base fundamental para esta interpretación es la existencia de una membrana íntegra de propiedades particulares, cuya naturaleza sería grasa, siempre que sea verdad que estas sustancias condicionan la ácido-resistencia. A este respecto no podemos dar una opinión categórica, pues, creemos que muchas membranas de constitución química distinta, satisfacen también las exigencias de nuestra interpretación. Así ocurre por ejemplo con los ooquistes de *Eimeria stiedai*, agente de la coccidiosis cunicular, los cuales son ácido-resistentes a condición de que su membrana permanezca íntegra: pues, cuando ésta presenta una solución de continuidad, los ooquistes no retienen ya el colorante bajo la acción de los ácidos minerales.

Facilitan y hacen más comprensible esta interpretación los detalles siguientes:

1º La acción de la fucsina se realiza por su penetración a través de la membrana, coloreándose la bacteria debido a la unión de la fucsina con la proteína protoplasmática (*fucsina + proteína = fucsina-proteína coloreada*).

2º El ácido penetra produciendo la disociación del complejo *fucsina-proteína coloreada* y, al mismo tiempo, la fucsina se transforma en combinación ácida y se decolora (*fucsina-proteína coloreada + ácido = combinación ácida de fucsina decolorada + proteína*)<sup>3</sup>.

3º Cuando las bacterias que contienen la combinación ácida de fucsina se ponen en contacto con el agua, la concentración del ácido en el interior de las bacterias se reduce por diálisis hasta desaparecer. Entre tanto la combinación ácida de fucsina contenida en las bacterias coloreadas no dializa, pero sí se disocia a medida que disminuye la cantidad de ácido. Simultáneamente ocurren pues dos fenómenos: a) la reaparición del color rojo por salida del ácido; b) la tinción de la bacteria por la fucsina que por disociación se pone en libertad, esto es, en otras palabras, la fijación del colorante a la proteína celular. Es bien evidente que estos fenómenos ocurren en cortísimo tiempo debido a las pequeñísimas dimensiones de las bacterias.

4º Queda por establecer si la retención de la combinación o solución ácida de la fucsina en el interior de la bacteria es debida a una menor difusibilidad de esta sustancia en relación a la fucsina (por la diferente constitución o naturaleza de los dos cuerpos), o si la membrana después de tratada por el ácido, presenta para la fucsina una permeabilidad mucho menor que la que tenía antes del tratamiento para esta misma sustancia. Esta última suposición puede desecharse por cuanto si las preparaciones del bacilo de Koch, fijadas por el calor, son tratadas previamente con ácido nítrico al 25 %, durante 5,10 y 30

<sup>3</sup> Quizá la proteína tampoco permanezca inalterada después de la acción del ácido; pero esto no importa por el momento al desarrollo de nuestra hipótesis.

métodos mecánicos (R. Koch). Basta la molienda de bacilos secos en un molino adecuado para que todos los restos de las formas bacilares pierdan su capacidad de retener colorante bajo la acción de los ácidos minerales. Esto no obstante, las sustancias céreo-grasosas del bacilo permanecen químicamente inalteradas.

Por tanto, la primera conclusión que deriva de este último experimento es que los lípidos del bacilo de Koch no son la causa de la ácido-resistencia; pero cabe advertir que esta conclusión solo aparentemente contradice las investigaciones que prueban la ácido-resistencia de algunas sustancias grasas, pues con esto no se niega, por ejemplo, la ácido-resistencia del mykol, ya que debe recordarse que la demostración de la ácido-resistencia de esta sustancia solo se ha efectuado con toda la masa del cuerpo químico que se obtiene después de repetidas extracciones.

Si las grasas no fuesen causa suficiente para originar la ácido-resistencia, sería necesario atribuir a otra u otras sustancias la propiedad complementaria que permite al complejo grasas-sustancias X, ser la causa determinante de la ácido-resistencia<sup>1</sup>.

Este complejo puede ser considerado: 1º una unión de naturaleza química; 2º una solución; 3º una mezcla de homogeneidad variable.

La desaparición de la ácido-resistencia obtenida por simple trituración de los bacilos, permite desechar que dicho complejo sea una unión de naturaleza química o una solución.

En cuanto a la mezcla de homogeneidad variable, colocándonos en el caso de que la repartición homogénea de la grasa es la causa productora de tal fenómeno, podríamos admitir que la trituración, por cambiar la disposición de los componentes de la mezcla, hace perder la característica ácido-resistencia al germen del cual nos ocupamos. Pero prueba de la falta de base de esta suposición son los experimentos siguientes: 1º una colonia de *Mycobacterium tuberculosis*, fijada en licor de ZENKER, incluida en parafina, fué seccionada en cortes de 2 micrones, que se trataron por el método de ZIEHL-NEELSEN. El examen de las preparaciones microscópicas así confeccionadas, demostró que las bacterias cortadas pierden su ácido-resistencia, mientras la conservan los bacilos enteros colocados horizontalmente en el plano del corte. 2º una colonia de *Mycobacterium tuberculosis* fijada en formol al 20 %, teñido *in toto* por el método de ZIEHL-NEELSEN, rápidamente deshidratada e incluida en parafina, es seccionada en cortes de 2 micrones. Observados estos cortes en el microscopio (claro está que después de desparafinizados, deshidratados y montados en resina Dammar), los bacilos cortados se presentan teñidos de rojo, esto es, conservan la ácido-resistencia. En cambio cuando estos cortes de colonia teñida *in toto* por el procedimiento de ZIEHL-NEELSEN, son nuevamente sometidos a la decoloración por el ácido y subsiguiente tinción de fondo con azul de metileno, entonces, los bacilos cortados ya no aparecen de rojo sino que se presentan coloreados de azul, mientras que los bacilos enteros colocados en el plano del corte conservan el color rojo adquirido con la tinción *in toto*.

Ya descartadas tales hipótesis, podemos enunciar nuestra interpretación de la ácido-resistencia diciendo que la sustancia grasa o forma una membrana o impregna totalmente la parte externa de la bacteria<sup>2</sup>. Por tanto la tinción del contenido celular del bacilo de Koch, se haría por pasaje del colorante a través de la membrana, en la cual la sustancia tintórea debe ser soluble, ya que se admite que la grasa ácido-resistente se colorea. Ya teñido el *Mycobacterium*

<sup>1</sup> Al hacer esta suposición admitimos, como por otra parte es generalmente aceptado, que las sustancias grasas son causa necesaria de la ácido-resistencia.

<sup>2</sup> En lo referente a la constitución del cuerpo bacteriano nada agregamos a lo universalmente conocido. Solo recordaremos aquí que las bacterias tienen una gran afinidad por los colorantes de anilina, determinada especialmente por la naturaleza proteica de su protoplasma.

Se deja enfriar y al otro día se añaden a la parte acuosa 4 volúmenes de alcohol a 96° que precipita las proteínas y sales, y se deja reposar 24 horas. Esta solución alcohólica, bien tapada, puede conservarse varios días, lo que permite mezclar las resultantes de varias partidas para trabajarlas conjuntamente.

El filtrado alcohólico de la precipitación de proteínas y sales, proveniente de un total de 40 Kgs de suprarrenales, se concentra nuevamente a baja temperatura a vacío hasta unos 4-5 litros. Se filtra rápidamente por papilla para eliminar toda impureza insoluble, se cubre con una capa de ligroina y se le añade  $\text{NH}_3$  gota a gota y agitando hasta un pH máximo de 9.5 (cuando vira el azul de timol).

Habitualmente, antes de llegar a ese pH comienza la cristalización, y con un poco de práctica, puede regularse la alcalinización por la formación de cristales.

Se deja 24 horas en heladera, y se filtra por Buchner lavando, sin dejar secar, primero con agua, luego con alcohol y finalmente con éter. Antes que seque bien, se pasa a un desecador y el éter se elimina haciendo vacío y dejando entrar aire (o mejor nitrógeno o  $\text{CO}_2$ ) y repitiendo la operación varias veces.

La adrenalina se obtiene como una sustancia blanca en unas preparaciones, en otras ligeramente amarillenta, que al microscopio se presenta bajo forma de rosetas formadas por agujas finas.

Funde con descomposición entre 210 y 212°. Punto de fusión de la adrenalina 212°. Poder rotatorio hallado variable según la partida entre — 48°.8, — 49°.8.

*Ejemplo:* 0.1404 grs de adrenalina básica disuelta en 20 cm<sup>3</sup> de cloroformo desvían — 0.35°, en un tubo de 10 cm.

$$[\alpha]_D = \frac{-0.35 \times 20}{0.1404} = -49°.8.$$

El rendimiento varía de 1.8 gramos a 2 gramos por kilogramo de glándula suprarrenal.