

Contribución al estudio de la psitacosis

II. - Empleo de la vía intranasal para aislar virus a partir de gárgaras y de esputo

Por R. J. CHIALVO y A. S. PARODI (*)

La sensibilidad de los ratones blancos a la inoculación intranasal del virus de la psitacosis ha sido comprobada con anterioridad (1, 2, 3). Los animales presentan una neumonía con lesiones bien características y por simple impresión de los pulmones se pueden observar los corpúsculos elementales.

Sin embargo la técnica aconsejada para el aislamiento del virus era a partir de esputo y por inoculación intraperitoneal a ratón blanco.

La adopción de dicho método como forma de rutina comporta dos inconvenientes: 1º) la enfermedad humana se caracteriza por la escasa productividad de la tos, lo cual imposibilita a veces el aislamiento del virus, y 2º) se ha señalado recientemente la existencia de cepas de virus de psitacosis que no son patógenas por vía peritoneal al ratón blanco (4, 5, 6, 7, 10).

De acuerdo a esta última observación ha variado el procedimiento para aislar el virus: cuando se trataba de material proveniente de animales, algunos autores han inoculado al ratón blanco, primero por vía peritoneal (lo cual no produce enfermedad aparente) y el segundo pasaje fué hecho por vía intracerebral o intranasal (5, 7, 8). Otros inoculan directamente por una de estas dos últimas vías (5, 10, 11).

Entre los casos en que se tuvo material proveniente de enfermos, el único que ha dado datos precisos es Eaton et al. (4) quien inoculó esputo y órgano de autopsia por vía intranasal aislando una cepa de virus de psitacosis con características muy particulares.

(*) De la Sección Virus del Instituto Bacteriológico «Dr. Carlos G. Malbrán» de la Dirección Nacional de Salud Pública. Estos estudios fueron subvencionados en parte por una donación de la International Health Division de la Fundación Rockefeller.

Presentado para publicar el 21 de diciembre de 1943.

A fines del año 1942 fuimos consultados (*) a propósito de un caso sospechoso de psitacosis, cuyo análisis clínico y epidemiológico se hace en otros trabajos (**). La dificultad de aislar esta cepa de virus por la inoculación intraperitoneal al ratón nos llevó a ensayar la vía intranasal directamente, extendiendo luego este procedimiento a otros casos; dos de ellos fueron infecciones de laboratorio, otros dos no guardaban conexión alguna con los anteriores y otro material fué una suspensión de órganos de loros aparentemente sanos, pero que fueron el origen probable de un pequeño foco de psitacosis.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron gárgaras y esputos de dos enfermos de psitacosis, gárgaras solamente de otros dos y suspensión de hígado y bazo de loros aparentemente sanos.

La inoculación fué hecha por vía intraperitoneal o intranasal; la inoculación intraperitoneal fué precedida, cuando fué necesario, de una inyección subcutánea de 0.4 cm³ de una suspensión oleosa de Dagenan quirúrgico al 15 % (9); este procedimiento probó ser eficaz también para diferenciar las lesiones pulmonares de origen bacteriano de las sospechosas de virus de psitacosis. La dosis de material inoculado por vía intraperitoneal fué de 0.4 cm³. Cuando se trataba de gárgaras éstas se inoculaban tal como habían sido extraídas (caldo diluído en partes iguales con solución fisiológica pH 7.3). Los enfermos se enjuagaban previamente la boca con agua lo cual disminuye considerablemente el número de bacterias patógenas.

Los esputos eran previamente triturados con alúmdum y diluídos aproximadamente diez veces con solución fisiológica y caldo.

La inoculación intranasal se hizo con 0.05 cm³ de material, previa anestesia etérea.

El intervalo entre los pasajes varió según el caso y las necesidades. Como rutina el pasaje por vía intraperitoneal se hacía cada 7 a 12 días y por vía intranasal cada 5 a 7 días; sin embargo, en pasajes posteriores hubo que acortar los intervalos según la virulencia de la cepa.

La identificación del virus se hizo por sus propiedades tintoriales y sus propiedades patogénicas. Se usó la coloración de Giemsa prolongada, diferenciando con acetona.

(*) Agradecemos al Dr. Marcos Steinbaum el envío del primer material de la cepa A. L. y a los Dres. Niceto Lóizaga y Salomón Averbach el material posterior de la misma cepa.

(**) Ver trabajo de los Dres. A. M. Vilches y S. Averbach.

Ver trabajo de los Dres. N. Lóizaga y S. Averbach.

En dos de los enfermos se estableció el diagnóstico por medio de la fijación de complemento usándose una suspensión de bazo o de pulmón (calentado a vapor fluente durante media hora) como antígeno. La técnica seguida para la reacción fué la aconsejada por Meyer con la única variante de usar sólo una dosis hemolítica de complemento frente a una dilución de antígeno de cuatro veces su poder anticomplementario. Se hicieron tubos testigos con suspensiones del mismo tejido usado para antígeno, pero proveniente de animales normales.

EXPERIMENTOS Y RESULTADOS

A continuación relataremos los experimentos llevados a cabo con cada uno de los cinco materiales mencionados.

CEPA A. D. L. — Con las gárgaras y esputo tomados en el 4º y 9º días de la enfermedad fueron inoculados 24 ratones blancos por vía intraperitoneal, 12 de ellos con inoculación previa de Dagenan. Ninguno de ellos mostró signos de enfermedad. Diez fueron autopsiados a los diez días, no presentando esplenomegalia ni cuerpos elementales en su peritoneo espleno-gástrico. Se hizo un pasaje por la misma vía a otros ratones pero esa línea se tuvo que abandonar porque la experiencia coincidió con una epidemia de salmonellosis en el criadero de ratones. Ninguno de los restantes presentó signos de enfermedad; fueron autopsiados al mes de la inoculación confirmando los hallazgos de los anteriores. No se hizo pasaje.

Las gárgaras y esputos fueron inoculadas independientemente por vía intranasal. En el primer pasaje dieron ya algunas lesiones y en el segundo éstas se hicieron bien evidentes y extensas matando desde entonces al ratón en 48 horas. Las impresiones de pulmón en el porta-objeto y la coloración por Giemsa permitieron identificar el virus.

Después de haber conservado las gárgaras a -76°C durante tres meses, se intentó nuevamente el aislamiento del virus por vía intraperitoneal. Se iniciaron líneas por vía intranasal a partir del segundo y quinto pasaje por vía intraperitoneal; los resultados fueron negativos, pero no podemos afirmar si eso se debió a la vía usada o, a la desaparición del virus del material original empleado, pues no fué posible tampoco el aislamiento de virus por inoculación directa intranasal de estas mismas gárgaras a los 5 meses de tomadas.

Intento de adaptación de la cepa a vía peritoneal una vez adaptada a vía pulmonar. — Se hicieron varios intentos para adaptar

esta cepa a la vía intraperitoneal después de haberla adaptado a pulmón. Los pasajes se iniciaron partiendo del sexto, séptimo y noveno pasaje pulmonar. En cada pasaje se inocularon 6 ratones. Cuando alguno de ellos evidenciaba estar muy enfermo o moría, se mataban 3 y se extraían los bazos, con los que se hacían pasajes por las vías intraperitoneal e intranasal. La finalidad de este último era de tener indicación sobre la existencia de virus y las modificaciones que sobre esta vía pudiese tener el pasaje intraperitoneal del virus. Los ratones restantes se observaban hasta su muerte. Del noveno pasaje intranasal, se hizo sólo pasaje por vía intraperitoneal (cuadro N° 1 y 2).

CUADRO I

Intento de adaptación de la cepa A. L. a vía intraperitoneal, a partir de pulmón de laucha (6° pasaje intranasal)

L. 2175 (6 i. n.)								
↓ _{i. p.}								
L. 2414	i. p.	L. 2440	i. p.	L. 2466	i. p.	L. 2505	i. p.	L. 2548
3/4 d.	→	1/5d., 2/7d.	→	1/4d., 1/11d.	→	1/8d., 1/9d.	→	2/8d., 1/10d.
E. M. +		E. M. +		E. M. +		E. M. +		
↓ _{E. M.}		↓ _{E. M.}		↓ _{E. M.}		↓ _{E. M.}		
L. 2441		L. 2448		L. 2506		L. 2549		
7/4d., 1/8d.		4/4 d.,		2/4 d., 1/5 d.		1/5 d., 1/7 d.		1/13 d.

CUADRO II

Adaptación a vía peritoneal de la cepa A. L. a partir del 9° pasaje intranasal

L. 2869 (9 i. n.)								
↓ _{E. M.}								
L. 2899	i. p.	L. 2958	i. p.	L. 2979	i. p.	L. 2998	i. p.	L. 3018
1/7d., 1/14d.	→	1/3d., 1/5d.	→	1/5 d.	→	1/3 d., 1/4 d.	→	1/4 d.
2 K/15 d.		1/6d., 1K/6d.		3 K/6 d.		1/5 d., 1 K/d.		2 K/5 d.

Los números indican el orden del protocolo.

E. M. = examen microscópico.

i. n. = intranasal.

i. p. = intraperitoneal.

+ = positivo.

K = sacrificadas para efectuar el pasaje.

El quebrado con el denominador seguido de una d. indica: el numerador el número de muerte, el denominador los días en que murieron los ratones blancos después de inoculados.

Como puede verse en el cuadro la inoculación intraperitoneal partiendo del sexto y séptimo pasaje mató a la laucha irregularmente aunque la inoculación intranasal del mismo material y el examen microscópico demostró la presencia de virus y su continua patogenicidad por esta última vía. En el noveno pasaje la adaptación se hizo fácilmente. El suero de este enfermo fijó el complemento en dilución 1/8 cuando se utilizó como antígeno bazo (de cepa heteróloga) y 1/256 cuando el antígeno fué pulmón (cepa homóloga).

La cepa fué posteriormente adaptada a vía cerebral.

CEPA R. Ch. — Se hizo inoculación intranasal de gárgaras. Estas fueron tomadas en el 15º día de la enfermedad. Todavía no había expectoración. En el segundo pasaje ya hubo lesiones. La identificación microscópica se hizo posteriormente. La inoculación intraperitoneal del mismo material (conservado a -76°C), dos meses después, no dió ningún resultado pero tampoco lo dió la inoculación intranasal efectuada cuatro meses y medio después.

CEPA A. S. P. — Este caso, como el anterior, fué una infección de laboratorio mientras se trabajaba con la cepa A. L. Se obtuvo gárgaras al tercer día de la enfermedad y esputo en el décimo día.

Gárgaras. — La inoculación intranasal de las gárgaras produjo lesiones al segundo pasaje. La inoculación intraperitoneal del mismo material tres meses y medio después no dió ningún resultado, pero tampoco lo dió la inoculación intranasal efectuada 5 meses después de tomado el material.

Las gárgaras tomadas dos días después de iniciada la convalecencia no demostraron la presencia de virus.

Esputo. — Fué obtenido el día 10º de la enfermedad. Se hizo inoculación intranasal a algunos ratones e intraperitoneal a otros. La inoculación intranasal mató a todos los ratones en el segundo pasaje al tercer día de haberlos inoculado. La inoculación intraperitoneal enfermó los ratones en el segundo pasaje, matando uno de ellos y presentando los otros una ligera esplenomegalia.

La comprobación microscópica no se hizo sino al cuarto pasaje. Cuatro meses después se inoculó el material por vía intranasal e intraperitoneal, demostrándose la persistencia del virus en el inoculum lo que confirma los resultados anteriores.

La reacción de fijación de complemento dió como resultado un título $> 1/256$ tanto con antígeno de bazo como de pulmón.

CEPA A. L. — Este caso fué completamente desvinculado de los anteriores.

Se obtuvieron gárgaras en el 14º día de la enfermedad, un día antes de la defervescencia y completa curación. Se inocularon por vía intranasal e intraperitoneal. Por vía intranasal mató a una laucha sobre cuatro en el segundo pasaje, dando en las otras extensas lesiones. La impresión de pulmón demostró la presencia de virus. La inoculación intraperitoneal dió en el primer pasaje una ligera esplenomegalia aunque nos fué imposible encontrar virus por el examen microscópico. Este fué hallado en el segundo pasaje. En el tercer pasaje mató dos lauchas sobre 4 inoculadas al octavo y noveno día; sin embargo, en el quinto pasaje mató una laucha en el día 12º, pero las restantes estaban sanas el día 21º, en que fueron matadas. La inoculación intranasal de los bazo de estos ratones aparentemente sanos dió extensas lesiones y el examen microscópico positivo.

CEPA B. B. — Se inocularon las gárgaras por vía intranasal a ratón blanco. Se observaron lesiones en el segundo pasaje y se comprobó la presencia de virus en la impresión. Todavía no se hizo la reacción de fijación de complemento.

CEPA LORO. — Se inoculó una suspensión de bazo por vía intranasal e intraperitoneal. Por ambas vías fué posible identificar virus de psitacosis.

Concomitantemente se hicieron pasajes partiendo de gárgaras de neumonías atípicas de etiología desconocida con resultado negativo. Esto nos sirvió de control.

RESULTADOS

De los 6 especímenes tratados fué posible obtener 6 cepas de virus de psitacosis por inoculación intranasal.

La inoculación intraperitoneal dió resultados negativos con la primera cepa cuando se inoculó directamente el material; hubo lesiones y muerte de los animales, pero con cierta inconstancia cuando el pasaje se hizo de suspensiones de pulmón de sexto o séptimo pasaje; en el noveno pasaje la adaptación fué inmediata. Posteriormente no fué posible demostrar la presencia de virus en el material original aunque éste fué conservado a -76°C . Debido a esta misma circunstancia no podemos afirmar si los resultados de la inoculación intraperitoneal de las gárgaras de las cepas *R. Ch.* y *A. S. P.* fueron realmente negativos. En cambio en el esputo de la cepa *A. S. P.* y con la gárgara de *A. Al.* o el material de loro, las dos vías fueron eficaces para aislar el virus. En la cepa *A. Al.* la vía intranasal resultó algo más eficaz, pues se notó una atenuación por vía intraperitoneal.

La fijación de complemento dió en el primer caso una diferencia de título cuando la reacción se efectuó en presencia del antígeno homólogo que cuando se efectuó con un heterólogo; sin embargo, como las reacciones no fueron efectuadas en el mismo día y el antígeno no fué titulado, no es posible sacar conclusiones de este resultado.

DISCUSIÓN

Los resultados consignados permiten discutir cuatro clases de hechos: 1º) la existencia de virus en líquido de gárgaras; 2º) el aislamiento efectuado por inoculación intranasal al ratón blanco, directamente del material en estudio; 3º) las características patogénicas de algunas cepas de virus y su modificación por el pasaje de animal a animal o animal a hombre, y 4º) la inactivación frecuente del virus contenidos en los gargarismos conservados a -76°C (cuadro N° 3).

El primer punto es particularmente interesante sobre todo desde el punto de vista epidemiológico. Hasta ahora el material usado era el esputo. Este se obtiene (cuando es posible) en un período avanzado de la enfermedad. En cambio, el aislamiento a partir de líquido de gárgaras permitió hacer el diagnóstico en los primeros días de la dolencia (3 y 5 días). Cabe pues, destacar la posibilidad de contagio interhumano antes de la aparición de los signos pulmonares cuando el diagnóstico clínico es todavía incierto.

La inoculación intranasal al ratón blanco como primer pasaje, partiendo del material en estudio, hace que se cubran mayor número de posibilidades en cuanto al aislamiento del virus. Efectivamente se han descripto recientemente cepas que no son patógenas por vía intraperitoneal al ratón (4, 5, 6, 7, 10). Los autores que han aislado dichas cepas lo han hecho con un pasaje inicial por vía intraperitoneal y un segundo pasaje a pulmón o cerebro. Nos pareció más lógica la inoculación directa por la vía intranasal. Esta vía es rápida y segura, aunque peligrosa para el operador y es aconsejable tomar todas las precauciones imaginables para evitar el contagio.

La primera cepa aislada, la A. L., no fué patógena para el ratón por vía intraperitoneal, aunque hay que advertir que no se hizo más que un pasaje. Sin embargo, esto contrasta con el pronto aislamiento cuando se inoculó por vía intranasal.

Durante los primeros pasajes por pulmón, esta cepa se mostró irregular y poco infectante para el ratón por vía intraperitoneal, pero al noveno pasaje la adaptación a vía peritoneal se hizo rápidamente. Ahora bien, la cepa A. S. P. que se originó en una infec-

CUADRO III

Cepa	Título fijación complemento	Investigación de virus						
		Material	Días de la enf. en que fué tomado	Días conservación a -76°C	Vía empleada	Resultado	Intervalo entre 1ª y 2ª tentativa de aislamiento	Resultado
A. D. L.	> 1/256	gárgaras	5	7	i. p.	-	171 días	-
		»	»	»	i. n.	+		
		esputo	9	2	i. p.	-		
		»	»	»	i. n.	+		
R. Ch.	no hecho	gárgaras	15	0	i. n.	+	120 días	-
A. S. P.	> 1/256	gárgaras	3	0	i. n.	+	150 días	-
		esputo	10	0	i. n.	+	» »	+
		»	10	0	i. p.	+	» »	+
A. Al.	no hecho	gárgaras	14	28	i. n.	+		
		»	»	»	i. p.	+		
B. B.	no hecho	gárgaras		1	i. n.	+		
Loros		Hígado y bazo			i. n.	+		
					i. p.	+		

i. n. = intranasal.

i. p. = intraperitoneal.

ción de laboratorio producida mientras se trabajaba con la cepa anterior, pudo aislarse a partir del esputo por las vías intranasal e intraperitoneal. Cabe entonces preguntarse si las variaciones en la característica de la cepa se debieron al material (esputo) o al período de la enfermedad (10 días) o, finalmente, al pasaje del animal a hombre.

Hay que señalar que la cepa A. Al., fué también algo más patógena por vía intranasal. Usando la vía intraperitoneal hubo una atenuación evidente de la cepa.

Hay que indicar todavía otro hecho que tiene un interés práctico: es la desaparición rápida de la condición infectante de los líquidos de gárgaras aun cuando hayan sido conservadas a -76°C , temperatura a la que se mantiene intacta la actividad del virus adaptado a la laucha. No sucedió lo mismo con el esputo, lo que hace pensar que las condiciones físicas, tal vez relacionadas con el contenido en mucina del material, intervengan en la conservación del virus a baja temperatura.

Es probable que el fracaso de varios autores en aislar el virus a partir de gargarismos, se deba a este último hecho.

RESUMEN

1º — Se aislaron seis cepas de virus de psitacosis, inoculando directamente el material en estudio por vía intranasal al ratón blanco.

2º — Los materiales utilizados fueron seis líquidos de gárgaras, tres esputos y una suspensión de órganos de loros.

3º — Una de las cepas aisladas no produjo enfermedad en el ratón blanco cuando se la inoculó por vía intraperitoneal pero se aisló rápidamente cuando se la inoculó por vía intranasal.

4º — Con dicha cepa sólo pudo obtenerse una acción patógena constante y marcada por vía intraperitoneal después del noveno pasaje por vía intranasal.

5º — Del esputo de un enfermo infectado en el laboratorio por la cepa anterior, se aisló el virus por vía intranasal e intraperitoneal.

6º — Se observó la inactivación del virus contenido en los gargarismos en tres casos sobre cuatro, aunque fueron conservados a -76°C .

7º — Se hacen consideraciones sobre la importancia del hallazgo del virus en líquido de gárgaras en los primeros días de la enfermedad, sobre la utilización de la vía intranasal directamente del material en estudio y sobre la posibilidad de que las cualidades patógenas de una cepa, experimenten variaciones por pasaje de animal a animal o de animal a hombre.