

ESTUDIO SOBRE LA VIRUELA

POR LOS DOCTORES

S. VON PROWAZEK Y H. DE BEAUREPAIRE ARAGAO

TRABAJO DEL INSTITUTO OSVALDO CRUZ DE MANGUINHOS

TRADUCCIÓN DEL DR. ADOLFO PIAZZA
DE LA FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA DE LA PLATA

La epidemia de viruela desarrollada en Río en 1909 nos proporcionó la oportunidad de hacer estudios sobre el virus productor de esta enfermedad. Los resultados de las experiencias entonces practicadas fueron reasumidamente publicadas en *Münchener Medizinische Wochenschrift* núm. 44, 1908. La forma aforística de esa comunicación dió lugar á interpretaciones erróneas, por lo que nos decidimos á volver sobre el asunto en forma más minuciosa.

I. EL PRODUCTOR DE LA VIRUELA

Para poder abordar más de cerca la cuestión del agente productor de la viruela, hicimos en primer término estudios de orientación sobre la filtrabilidad del virus, y así nos pudimos convencer que el virus de pustulas recientes, mientras no se encuentre mezclado con gran cantidad de detritus celulares, el virus que además de obstruir los poros, lo absorben, atraviesa los filtros de papel grueso, asbesto, Berkefeld y Uhlenhuth. Con los filtrados así obtenidos, con-

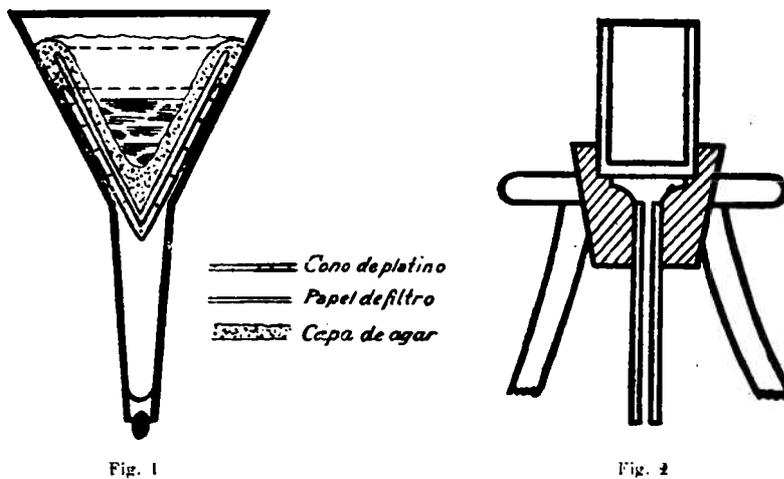
seguimos siempre inoculaciones positivas en la cornea de los conejos. La cornea inoculada era cuidadosamente extraída al cabo de 24 horas, fijada con el sublimado alcohol-incluida en parafina, y los cortes coloreados, las más de las veces, con la hematoxilina férrea de Heidenhain. En la mayoría de los casos pudieron ser observados los corpúsculos de Guarnieri, típicos de la viruela. Nos esforzamos por liberar cuanto fuera posible el virus del suero y de la albúmina, lavándolo prolijamente por mucho tiempo, por lo que simultáneamente se enriquecía. Para conseguirlo y teniendo presente lo que ya se había hecho con el virus de la Hühnerpest, filtramos el material fresco á través de capas coloidales (agar á 3 %). Se empleó el método siguiente: un filtro de papel bien mojado con solución fisiológica, fué colocado en el interior de un embudo pequeño fijado por un cono de platino, adhiriéndose mediante la aspiración de la trompa de agua. El agar se aplicó dos ó tres veces, de manera que el papel de filtro quedase bien impregnado, dejando que se acumulase un pequeño depósito en el fondo. La condición capital para obtener éxito en la filtración, consiste en que el agar impregne por igual toda la superficie del papel de filtro, sin que se formen burbujas. Se impregna el filtro lanzando sobre él cierta cantidad de agar licuado, girando el aparato en posición horizontal, de manera que el coloide se solidifique, formando una delgada capa.

Después de solidificado el agar, héchase en el filtro el filtrado que ya se ha obtenido por, el pasaje, á través de papel de material de pústulas, un poco diluido en solución fisiológica y se deja filtrar por aspiración lenta de una á tres horas (fig. 1).

La filtración debe ser sometida á continua vigilancia, pues después del pasaje de las últimas porciones de líquido, la camada coloidal fácilmente se agrieta, y en este caso, el material queda inutilizado. El tenue depósito obtenido sobre la masa del agar se extiende con anza de platino en porta objetos para preparados, se desecan, privándolos del suero por lavajes sucesivos con agua destilada, se desecan nueva-

mente y se fijan en alcohol absoluto durante algunas horas, luego se coloran con la fucsina anilizada de Loeffler.

Para obtener las mayores proporciones de filtrados, procedióse según las indicaciones de Giemsa, así: impregnóse repetidas veces de agar una bujía Pukal cortada, de manera, que después de la solidificación del coloide, se formase en su interior una delgada y regular camada á través de la cual se hizo la filtración. Por intermedio de un tapón de goma



perforado, la bujía se unía á un tubo de vidrio capilar de paredes gruesas y que entraba en el interior de un frasco de filtración. El denominado ultra filtrado es recibido en un tubo de ensayo estéril (fig. 2).

Para obtenerse material libre de gérmenes, en algunos casos el contenido de las pústulas era diluido y pasado á través de bujía Berkefeld y así mayor proporción de ese filtrado se obtenía con el filtro de coloide arriba referido. Por el mismo procedimiento se podía conseguir vacuna libre de bacterias. Para este fin es menester previamente triturar con cuidado el material de la vacuna, diluirlo, pasarlo á través de filtro Berkefeld y concentrarlo finalmente en filtros de coloide. En todos los casos en que investigamos, pudi-

mos constatar en los preparados coloreados por el método de Loeffler, corpúsculos redondos, extremadamente pequeños, nítidamente diferenciados, coloreados de rojo oscuro y que á veces se dividían bajo la forma de diplococos. Eran más pequeños que las menores formas microbianas hasta hoy conocidas. Los corpúsculos de la viruela se multiplican por una especie de bipartición después de cierto aumento de tamaño. No toman el Gram; se coloran por la fucsina de Ziehl, por la eosina-azul de Giemsa y por la tionina. Contrariamente á lo que se verifica con los estreptococos y con los núcleos de los leucocitos, no se coloran aun después de largo contacto con el Neutralrot ó el Brillantkresylblau. En estado vivo se presentan bajo la forma de pequeñísimos puntos que refractan moderadamente la luz (brillantes). Como fueron encontrados estos cuerpos recientemente por nosotros, en materia de la viruela, así como fueron ellos obtenidos en el filtrado de las bujías Berkefeld, concentrando en un filtro de coloide, con ausencia de cualquier otra forma microbiana, y como con este producto obtuvimos con éxito la inoculación de la cornea de conejo, nos juzgamos autorizados á considerarlos como microbios de viruela.

Cuando efectuamos esas experiencias, ya existían sobre el mismo asunto, tres trabajos que se podían relacionar con nuestras observaciones: el de Casagrandi, Volpino y el de Paschen. Sobre la cuestión de ser todas las figuras vistas idénticas, diremos apenas algunas palabras, por cuanto Volpino (2 Cetraltblatt f. Bakt, Bd. 49, H. 2) ya describió en un artículo de síntesis, los caracteres de todos los corpúsculos encontrados hasta hoy en la viruela. Juzgamos, sobre todo, que se deben comparar los corpúsculos descriptos por Volpino y Paschen. Nuestros corpúsculos aseméjanse más en lo que respecta á la morfología y aspecto á los descriptos por Volpino. Las características dadas por Volpino concuerdan esencialmente con las de nuestro descubrimiento, á excepci6n de que no encontramos en los nuestros, grandes movimientos comparables á los que se observan en los infusorios y flajelados. No negamos, sin embargo, la existencia de cierto movimiento de los corpúsculos en cuesti6n, movi-

miento análogo al de las granulaciones de pigmento de los parásitos de la Malaria ocasionados por la formación de los flajelos. Los corpúsculos que Paschen fué el primero en describir en la vacuna y de los cuales tuvimos, para comparación, un preparado (de corpúsculo de la viruela) son relativamente á los nuestros un poco más grandes (1.2 micromilímetro), diferencia ésta que Paschen atribuye á los métodos de coloración. Al principio concordábamos en una diferencia de tamaño del virus variolico, en relación al vacínico, pero ya no pensamos de ese modo. Quien fué el primero que observó los verdaderos corpúsculos, es cuestión difícil hoy de decidir porque para la diferenciación de ellos, casi no existen características morfológicas y las dimensiones varían según la coloración, (Paschen) el modo de hacer el preparado y el estado de conservación del material. Los corpúsculos descritos en primer lugar, por Prowazek, como corpúsculos iniciales, los consideramos como estados de evolución del virus; Paschen fué el primero en describir, de modo indubitable, corpúsculos menores que aquellos.

Los corpúsculos arriba descritos representan, como ya dijimos, apenas el estado vegetativo del virus variólico. Inoculándose ese virus en la cornea de conejos, algunas veces presentáronse visibles en el protoplasma de las células epiteliales, figuras mayores, en vía de multiplicación, las que son idénticas á los corpúsculos iniciales anteriormente descritos. Estos últimos estadios de evolución encuéntranse incluidos, en los primeros periodos de la infección, en los corpúsculos de Guarnieri, y en los cortes bien continuados en serie, coloreados por la hematoxilina férrea, azul Victoria, violeta de genciana, eosina-azul de Giemsa; muéstranse bajo la forma de corpúsculos intensamente coloreados, redondeados ó alargados en el interior de una especie de vacuolo de los corpúsculos de Guarnieri. En ellos, como ya se ha dicho, obsérvase un cierto movimiento oscilatorio.

La subsiguiente transmutación de ese figura en corpúsculos de Guarnieri no fué verificada con seguridad.

Los preparados de pústula variólica frescos, fijados por el sublimado alcohol y coloreados después por la hematoxilina,

muestran, al lado de muchos leucocitos polinucleares, algunas veces, cuerpos ovalares ó redondos, intensamente coloreados y que no son más que restos degenerados de nucleos de leucocitos polinucleares. Entre esos cuerpos y los nucleos de leucocitos que mueren, encuéntrase todos los estadios intermediarios.

Para la interpretación de los corpúsculos de Guarnieri como producto de reacción de la célula y mayormente del componente plastínico del núcleo, es interesante señalar el hecho de que, ni en todos los casos ellos se colocan junto á los nucleos, como figuras independientes, pero, muchas veces solo se verifica el aumento de volumen de los nucleolos. En un caso en que se inoculó virus variólico, con suero de varioloso de 21 días, no se formaron corpúsculos de Guarnieri intraplasmáticos, pero, en compensación, los nucleolos de los nucleos estaban en tal forma aumentados, que se imponían como corpúsculos de Guarnieri. Después de la inoculación de vacuna en el párpado interno del Gecko, púdose verificar un aumento de los nucleolos. Respecto á la biología del productor de la vacuna, consignamos aquí los siguientes hechos: el virus muere después de un contacto de 24 horas con la saponina, bilis, tauro, colato y oleato de sodio; por la acción de la lecitina marca Afga, seguida de 3/4 de hora de centrifugación y 4 horas de sedimentación, obtiéndose sobre la cornea del conejo, apenas una reacción limitada enteramente local. En los leucocitos coloreados por el método de Loeffler obsérvanse inclusiones en forma de granulación en el interior de los vacuolos, redondos ú ovalares, nítidamente limitados y que se asemejan á los corpúsculos descriptos.

El denominado ultra-filtrado obtenido por el pasaje á través de camadas coloidales no contenía más virus activo; conejos inoculados por la vía subcutánea con ese producto, por tres veces en el intervalo de 4 días, con 2 c. c. cada vez, no presentaron síntoma mórbido alguno y no se hallaban inmunes cuando se inoculaban con material virulento como acontece en la Hühnerpest, con las gallinas inoculadas con el ultrafiltrado.

II. CIRCULACION DEL VIRUS VARIOLOSO EN EL ORGANISMO

Muchas veces se hicieron inoculaciones sobre la piel raspada del abdomen y en la cornea del conejo, con abundante material de sangre, suero, parénquima de bazo, riñón é hígado de individuos que sucumbieron á la viruela confluyente ó hemorrágica. Para obtener tales parénquimas se reducían los órganos á experimentar á fragmentos y después se les trituraba cuidadosamente en un mortero. En algunos casos obtuvimos apenas reacción positiva macroscópica. En un caso de inoculación con sangre de viruela hemorrágica hecha no solo en las dos corneas sino también en la piel raspada de 4 conejos (abdomen), obtuvimos apenas en una cornea una reacción retardada, al fin de 6 días y los cortes revelaron en ella la presencia de los corpúsculos de Guarnieri. El virus á veces atraviesa la placenta, é inoculaciones con resultado positivo fueron obtenidas en corneas de conejos con el parénquima de hígado del feto de una mujer, fallecida por viruela confluyente. En las corneas así inoculadas pudieron caracterizarse pocos corpúsculos de Guarnieri, 3 días después de la inoculación. Es digna de nota la circunstancia de que el feto no presentaba ningún signo exterior de la enfermedad.

De esas experiencias se deduce que hay generalización del virus variólico, pero que en general, ella dura apenas un tiempo determinado y, más tarde, después de la erupción de las pústulas solo por la experimentación se puede comprobar una escasa circulación de virus. Según Calmette y Guerin aún después de la inoculación endovenosa, el virús vacínico solo circula en el organismo por espacio de 24 horas; durante este período se puede obtener una formación artificial de las pústulas vacinales, raspando ó arrancando los pelos de los conejos inoculados. De estas experiencias se deducen además los hechos de que: 1º El virus manifiesta la tendencia de localizarse en las células, multiplicándose allí. 2º de que su presencia no es constante en los líquidos del organismo.

Es más bien un parásito de las células que de los líquidos orgánicos. Es admirable que con el jugo obtenido exprimiendo órganos internos, apenas se hayan conseguido pocos resultados positivos de inoculación, mientras que con el material de las pústulas, sin otra preparación, se obtuvieron en todos los casos, inoculaciones positivas. Dedúcese de estos hechos, que carecen de ulterior comprobación, que, después de la generalización del virus de la protopústula hipotética de Bleiffer, todas las células según las experiencias de Meyer y Keysselitz reaccionan al estímulo del antígeno por una hiperplasia peculiar de la sustancia nucleolar, pero que después se sitúa de preferencia en el ectoderma ó en el tejido subcutáneo colageno (Nobel y Hückel) y que de allí también parte la inmunidad. A favor de esta manera de ver concurre también la pequeña cantidad ó ausencia de anticuerpos en el suero sanguíneo y la inmunidad cutánea admirablemente duradera.

III. LOS FENOMENOS DE INMUNIDAD EN LA VIRUELA

En nuestras experiencias procuramos verificar como se comportaría, inoculado en la cornea del conejo, el suero de convalescientes de viruela, tomado 12, 14, 15, 20, 24, 30 y 40 días después de la cicatrización de las pústulas variólicas, recogido tanto como fuera posible, en pústulas frescas, y dejados en contacto durante 20 á 24 horas en la heladera agitándolo repetidas veces. Las experiencias de Voigt demostraron que la viruela humana inoculada en la cornea de los conejos produce síntomas típicos aunque no muy violentos y que se puede constatar por medio de cortes la existencia de corpúsculos de Guarnieri. Consideramos la ausencia de esos corpúsculos, en la cornea, como un indicio de reacción parasiticida del suero utilizado. Nótese aquí sin embargo, que también en la viruela humana, en las células de la cornea de los conejos, no se encuentran siempre los corpúsculos de Guarnieri junto al núcleo, pero que muchas veces solo se verifica un aumento de los nucléolos en el in-

terior del nucleo. Hechos análogos fueron comprobados en la cornea del hombre infectado por la viruela. Una causa perturbadora para el examen microscópico de una inoculación corneana es la de que muchas veces conjuntamente con la linfa se inoculan estreptococos que producen alteraciones progresivas del epitelio corneano. Macroscopicamente la cornea reacciona en todos los casos como ya varias veces se ha descrito. Microscópicamente siempre fueron constatados los corpúsculos de Guarnieri, aunque en cantidad variable. El suero de 12 á 14 días, de acuerdo con esos experimentos, mata definitivamente el virus variólico. Bajo la influencia del suero de 12 días, el número de corpúsculos de Guarnieri, no era muy considerable; el suero de 14 días permitía la formación de mayor cantidad de corpúsculos, y bajo la acción de suero de 49 días, aparecían no solo aumento de volumen de los nucléolos, sino también se verificaba al lado de los nucleos la presencia de los corpúsculos de Guarnieri. El suero variólico, después de un cierto tiempo, cuando mucho, atenúa el virus y demuestra ausencia de anticuerpos, en general. Del mismo modo el virus variólico no se deja influenciar por la acción de un suero vacínico proveniente de un hombre alerjetico, inoculado repetidas veces por espacio de 3 años, así como también, la vacuna no es influenciada por el suero de varioloso de 12 días de enfermedad, recogido después del desaparecimiento de los síntomas mórbidos, de la manera ya referida.

En la epidemia que tuvimos ocasión de observar, el virus variólico encontrábase siempre asociado á un estreptococo, existiendo entre ellos una relación de simbiosis ocasional análoga á la de las complicaciones de la escarlatina, contribuyendo para la gravedad de su decurso. Inoculaciones hechas con esos dos microorganismos, en serie de experiencias perfectamente determinadas, dieron en todos los casos observados, resultados muy particulares. Tratándose corneas de conejos con una mezcla de:

1º Virus variólico (tanto como sea posible material recogido en pústulas frescas).

2º Suero activo (es indiferente que se tome suero normal de hombre, caballo ó suero vacínico ó variólico del 12º al 40º día) y

3º Estreptococo (vivos ó muertos por un calentamiento de media hora á 60º) verificase en comparación con los testigos correspondientes, que ya al fin de 24 horas, hay reacción extremadamente intensa con pérdidas progresivas del epitelio, leucocitosis y profundas erosiones. Las pérdidas epiteliales eran muchas veces muy considerables y por una especie de citolisis, las células pigmentadas del limbo corneano caminaban centripetamente. Encontrábanse los estreptococos entre las células epiteliales; más tarde, también, bajo la forma de agrupaciones entre las fibras del tejido conjuntivo bajo puesto á la membrana basal. Como testigos se hicieron inoculaciones, con las siguientes mezclas, preparadas 24 horas antes:

1º Estreptococos vivos más sueros de diversas proveniencias.

2º Virus variólico más sueros inactivos de proveniencias diversas.

3º Suero solo.

4º Estreptococos solos.

5º Virus variólico normal, solo.

6º Virus inactivo, á 45º.

7º Estreptococos más virus variólico.

Pensamos en ejecutar las experiencias más exactas, empleando en las mezclas citadas y dejando en contacto 24 horas, el virus variólico previamente pasado á través de bujías de Berkefeld. Desgraciadamente, éstos ensayos no dieron resultados claros, por el hecho de que filtrando se reducía en mucho la cantidad de virus. Sin embargo de esas experiencias resulta que, para que se establezca una intensa reacción deben coexistir 3 elementos: virus variólico, toxina estreptocócica y la parte termolábil de un suero cualquiera. Estos hechos nada tienen que ver seguramente con la inmunidad, porque, en todos los casos, en las pocas células todavía conservadas, selveían corpúsculos de Guarnieri, así como también la especie de suero usada no tenía influencia

sobre el resultado. La asociación ocasional del virus variólico y el estreptococo pertenece según Frank (Contribución para la biología de las plantas, 1877) al grupo de los fenómenos biológicos descritos bajo el nombre de simbiosis, pero aquí se trata de pseudo parasitismo, porque los dos organismos son, en lo que respecta á alimento, independiente uno de otro. Ellos pueden también subsistir independientemente pero, si ocasionalmente se asociaran, obran perturbando doblemente el organismo atacado. Ward (Philos. Trans, 1892) describió esa "asociación dijuntiva" de dos organismos que ocasionalmente ejercen uno sobre otro y de manera transitoria relaciones de cambios, bajo el nombre de Meta ó Antibiosis (antagonismo de Bary). Pfeiffer consideraría el caso aquí descrito como una simbiosis dijuntiva. Con relación á la infección del organismo, debemos agrupar los fenómenos de simbiosis en tres secciones:

1º Simbiosis que absolutamente no se influyen en sus modos de vivir (simbiosis indiferentes).

2º Simbiosis que adquieren una cierta exaltación de virulencia y así perjudican en mayor escala al organismo atacado (simbiosis sinérgicos).

3º Simbiosis, de los cuales uno prepara el alimento para el otro.

Así al *Aspergillus orizae* y el *Mucor orizae* le prepara el alimento para la fermentación sacarificándole el almidón (simbiosis antibióticas).

Al segundo grupo pertenece la simbiosis aquí descrita entre el estreptococo y el virus variólico. Igual hecho se verifica entre el estreptococo y el agente productor de la escarlatina. Del mismo modo obran sinérgicamente, según Leclainche y Vallée (Ann. Institut. Pasteur, 1900) una *estreptotricea cromógena* ó un estreptococo no patógeno, con el bacilo del carbunco sintomático. Al contrario es inactiva la asociación del *Bac. rhusiopathiae* sui ó el *Bacterium coli* con el mismo virus del carbunco sintomático.

La explicación más simple y natural para la acción simbiótica de conjunto de los dos microorganismo parece ser, que, en primer lugar las células epiteliales son lesionadas

por el virus variólico y reaccionan por la hipertrofia de uno de los componente celulares, que se relacionan microscópicamente con la substancia nuclear (corpúsculos de Guarnieri); en virtud de esta desproporción, el proceso vital sufre un debilitamiento y no puede oponer resistencia alguna á la toxina del estreptococo.

Las toxinas parecen perjudicar directamente a protoplasma de las células, por lo que muere éste con rapidez. Secundariamente los cocos se multiplican con vivacidad y afectan de varios modos las demás circunscripciones orgánicas. Las células anormales del cuerpo en relación con las normales, sufren más perjuicio con el ataque de los estreptococos, con lo que está de acuerdo la observación de Janicke y Neisser (Zentralbl. f. Chirurgie 1884) que, á consecuencia de una inoculación de erisipela en un enfermo de carcinoma, verificaron que los estreptococos produjeron un proceso regresivo de las células carcinomatosas. De que en este caso, se trate en realidad de la toxina estreptocócica es verificable, por cuanto el mismo resultado se obtiene, empleando culturas de estreptococos muertos por el calor. Según Lingelsheim los venenos del estreptococos son bastantes resistentes al calor. Papel análogo al representado en la viruela, ejercen los estreptococos en varias afecciones vacinicas, en el impetigo (Balzer, Griffon, Meslay y Kurth) en el exantema escarlatinoso y reumatismo articular. También se atribuye el exantema de la escarlatina traumática á la acción tóxica del estreptococo. También de acuerdo con la definición de simbiosis arriba dada, puede existir viruela sin estreptococos, así como Rumpel observó casos de escarlatina, en los cuales el estreptococo no eran caracterizables.