EFECTO DE LA INOCULACION INTRACUTANEA DE BRUCELLAS EN EL COBAYO. LA MULTIPLICACION INTRACELULAR DE LOS GERMENES

JAVIER ARIAS-STELLA

Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima

(Recibido para su publicación el 30 de Diciembre de 1950)

La oportunidad de haber realizado varias autopsias de casos de Brucellosis, enfermedad que cada vez toma incremento en nuestro país, ha despertado nuestro interés por el estudio de los aspectos Patológicos y Patogénicos de este mal. Hemos estudiado la Anatomía Patológica en humanos y animales e investigado el papel de la resistencia, sensibilización y multiplicación intracelular en la Patogenia de la enfermedad (1).

En esta nota vamos a presentar algunos de los resultados experimentales obtenidos.

No hemos encontrado estudios histológicos previos sobre la sucesión de fenómenos producidos "in situ" por la inyección de gérmenes en la piel. En general, parece haber preocupado poco a los investigadores las alteraciones locales originadas por las brucellas en el sitio de inoculación. MEYER, SHAW y FLEISCHNER (2) encontraron que en algunos casos la piel del escroto se ulceraba cuando se hacían inoculaciones intratesticulares. SMITH (3) en 1926 señaló "The cutaneous inoculation usually produced suppurating kneefold nodes up to 1 cm. in diameter. After 9 or 10 weeks these were mere sacs filled with a cheesy mass which emerged from the incision under pressure as a tape like mass'. BURNET, citado por ZDRODOWSKI (4), encontró que "apres l'infection sous-cutanee simple, on n'observe pas de reaction locale, et en meme temps on constate un gonflement des ganglions lymphatiques voisins". FORBUS (5) sostiene

que las brucellas ordinariamente no producen alteración en el sitio de invasión, añade, sin embargo, que cuando entran a través de piel traumatizada puede ocurrir una lesión local específica acompañada de reacción secundaria en los ganglios linfáticos regionales.

Tratando de estudiar escalonadamente la acción del germen sobre los tejidos y la respuesta de éstos hemos investigado los fenómenos producidos por la inoculación intracutánea en cobayos. Procedimos así porque en la piel es muy fácil la obtención de biopsias y se puede, entonces, seguir cómodamente la reacción macro y microscópicamente. Los resultados obtenidos dan una pauta de la relación germen-organismo y han permitido demostrar experimentalmente el proceso de multiplicación intracelular de las brucellas.

Material y Método: Como inóculo utilizamos una cepa de Brucella melitensis aislada en uno de nuestros casos fatales humanos (autopsia 354—1950)*. En un lote de 20 cobayos se hizo un estudio previo de aglutininas para brucellas por el método de Huddleson, resultando todos ellos negativos. Luego de afeitar la piel del abdomen se inyectó intracutáneamente, en 4 zonas distantes de cada animal, 0.05 cc. de una suspensión de gérmenes preparada en la proporción de 3 cc. de suero fisiológico para el producto de 10 tubos de Agar-papa de 48 horas. No siempre es fácil hacer la inoculación intracutáneamente, hemos encontrado adecuado introducir la aguja primero al subcutáneo y luego alcanzar el dermis de abajo hacia arriba; así se consigue hacer la inoculación, por lo menos, en el dermis profundo. Se puso atención en la reacción macroscópica en el sitio de la inyección y en la evolución de los ganglios regionales. Se tomaron biopsias de piel, siempre en varios animales, a las 5, 12, 24, 48, 55, 96, 127, 178, 192, 216, 248, 288, 312, 336 y 456 horas. En el momento de tomar las biopsias se hicieron topes con la superficie de sección, o frotis con raspados de zonas elegidas. En muchos casos se practicaron cultivos. Se hizo también biopsias de ganglios regionales. Se utilizó las coloraciones de Hematoxilina-Eosina, Giemsa y Gram.

Resultados: Más o menos a partir de las 12 horas comienza a observarse una pequeña zona eritematosa en el lugar de la inyección, la cual va aumentando lentamente, transformándose entre las 12 y 48 horas en una pápula eritematosa. En los días siguientes continúa el desarrollo; la

* La verificación bacteriológica fué realizada por el Dr. Gurmendi, de la Sección de Bacteriología de los Laboratorios de las Clínicas Fac. Med., Hospital Loayza.

pápula muestra cada vez mayor densidad hasta adquirir consistencia nodular. Entre los 6 y 10 días queda constituido un nódulo de 0.5 a 1.5 ctms. en el cual aparece fluctuación central. En el período que va desde el octavo al décimotercero día la reacción macroscópica alcanza su máximo grado, el reblandecimiento aumenta, en zonas del nódulo la piel se adelgaza y presenta placas cianóticas, llegándose finalmente a la ulceración espontánea. Fluye entonces material grumoso, espeso, amarillento. Producida la evacuación del pus la lesión comienza a regresionar. Cuando la ulceración ha sido amplia, y abundante el material necrótico expulsado, la involución del proceso se hace con gran rapidez. En dos días puede establecerse una cicatriz. En el caso contrario, la pequeña ulceración elimina lentamente el contenido nodular en el curso de varios días. En algunos animales observamos que el pequeño nodulillo constituído en los tres primeros días permaneció más o menos estacionario hasta el sétimo u octavo, período en el cual bruscamente inicia un rápido desarrollo que culmina ulcerándose entre el 12 y 13 día. Si la inoculación se hace en el tejido celular subcutáneo no se produce alteración.

El aumento de volumen de los ganglios regionales es aparente desde la segunda semana. Evolucionan lentamente, llegando a alcanzar 4 a 5 mm. de diámetro. Sólo tardiamente, a las 4 ó 5 semanas, puede verse grandes focos necróticos en la superficie de sección.

Histológicamente encontramos en la piel, a las 5 horas: edema, congestión y débil infiltración del dermis superficial, y algo más pronunciada en la parte profunda, con histiocitos y polinucleares eosinófilos; éstos en mayor número. Sólo algunos macrófagos perivasculares muestran brucellas en el protoplasma. Se ve histiocitos parasitados rodeados de polinucleares.

Entre las 12 y 48 horas hay varios focos dérmicos constituídos por acúmulos de polinucleares, marginados por histiocitos y raro linfocito o monocito. Algunas células parasitadas. La reacción inflamatoria llega, en zonas, al plano muscular.

A las 55 horas los focos del dermis profundo han confluído formando uno grande que muestra una parte central de polinucleares eosinófilos y raro neutrófilo entremezclados con algunos macrófagos. Rodeando a la mitad inferior de este foco se aprecia una banda de proliferación histiocitaria parcialmente invadida por eosinófilos. Hay brucellas en el protoplasma de algunos histiocitos.

Entre las 96 y 178 horas el gran foco de polinucleares del dermis profundo comienza a migrar hacia la superficie, las células muestran de-

generación protoplasmática y picnosis y rexis nuclear. En la base del foco la banda de histiocitos y eosinófilos es bien neta; por debajo se dibuja una faja de histiocitos y fibroblastos. En este período se hace evidente un notable incremento en el número de células parasitadas.

En la mayoría de los animales la reacción local alcanza la superficie de la piel y el máximo grado de intensidad entre las 178 y 312 horas. El foco de polinucleares eosinófilos invade y lisa la epidermis; las bandas histio-eosinófila e histio-fibroblástica adquieren su mayor desarrollo. Durante esta fase prácticamente todos los histiocitos llegan a estar parasitados. Se ve gérmenes también, pero en menor número, en polinucleares y fibroblastos.

Producida la ulceración, el pus es evacuado total o parcialmente, eliminándose con él muchos macrófagos parasitados. El estudio histológico muestra, cuando la ulceración es amplia, un cráter desprovisto de epitelio en cuya base hay delgada cubierta de polinucleares y por debajo las bandas histio-eosinófila e histio-fibroblástica. Las células de estas fajas están llenas de gérmenes. El proceso involuciona desde el momento y los macrófagos parasitados comienzan a disminuir siendo acarreados por vía linfática. En solo un animal vimos transformación caseosa del exudado y células gigantes.

El proceso de multiplicación de las brucellas lo hemos seguido mejor estudiando los frotis o topes que hacíamos al tomar las biopsias. El tejido situado por debajo de la base del foco purulento y que correspondía a la banda de proliferación de histiocitos es el que nos ha servido para hacer los frotis. Utilizamos las coloraciones de Giemsa y May-Grunwald Giemsa. Así hemos podido hacer una apreciación cuantitativa del número de células parasitadas. En las primeras horas sólo un 5 % ó 10 % de los histiocitos mostraban gérmenes en el protoplasma. Conforme aumentaba el número de días este porcentaje fué incrementándose hasta llegar al período correspondiente entre las 178 y 336 horas en el cual el 100 % de los histiocitos estaban parasitados. Los gérmenes se han visto también en polinucleares. No todos los macrófagos mostraron un parasitismo semejante, mientras que unos tenían uno que otro microorganismo otros presentaban el protoplasma totalmente lleno de gérmenes. En algunos casos se ve verdaderas microcolonias en un polo de la célula en tanto que la otra parte del citoplasma puede estar fagocitando polinucleares o detritus celulares. Picnosis y vacuolización protoplasmática puede aparecer también en los histiocitos parasitados.

En los ganglios linfáticos la primera manifestación originada al in-

greso de los gérmenes se caracteriza por una hiperplasia difusa de grandes monocitos, los que se ven formando mantos en pleno retículo o llenando los senos; después de las 336 horas hemos visto focos circunscritos de clasmatocitos en necrobiosis y arteriolas con hialinización o necrosis fibrinoide de la pared. Puede haber fusión purulenta en las zonas de necrosis. Los gérmenes se ven en los cortes teñidos con Giemsa, o mejor en los topes preparados en el momento de las biopsias. A las 240 horas apreciamos el mayor número de histiocitos ganglionares parasitados.

Comentario: Se ha relatado las características histológicas del proceso originado por la inoculación intracutánea de brucellas. El ingreso de estos gérmenes al tejido dérmico da lugar a una reacción inflamatoria aguda, formándose un foco de polinucleares eosinófilos entremezclados con macrófagos parasitados y neutrófilos. Primero situado en la parte profunda, este foco emigra hacia la superficie por el aumento de volumen y por el desarrollo de bandas basales de proliferación histiocitaria y fibroblástica. Alcanzada la epidermis se produce la ulceración. El propósito de la inflamación de "circunscribir, destruir y eliminar la noxa" se ve burlado por la capacidad del germen de multiplicarse intracelularmente, pues hemos visto cómo, expulsado el pus y regresionada la reacción, quedan las bandas histio-eosinófila e histio-fibroblástica parasitadas. Los gérmenes son pronto trasladados a los ganglios linfáticos regionales donde se multiplican. Nuestras observaciones no se oponen a las macroscópicas señaladas por SMITH y BURNER pues ellas corresponden a la inoculación subcutánea.

Especial interés tiene la experiencia realizada al haberse podido verificar y demostrar experimentalmente la capacidad de las brucellas de multiplicarse en el soma celular.

En 1919 THEOBALD SMITH (6) describió, en placenta bovina, la presencia de brucellas en el protoplasma de las células del epitelio corial; algunas estaban totalmente llenas de parásitos; encuentra también histiocitos adventiciales con gérmenes y adelanta la idea de que hay multiplicación intracelular. Esta singular observación no ha merecido comentario o verificación hasta los últimos años. En 1937 GOODPASTURE y ANDERSON (7) inoculando la membrana corioalantoica de embriones de pollo encuentran que la brucella abortus es capaz de utilizar el protoplasma celular para su desarrollo. BUDDINGH y WOMCK (8) en 1941 inoculando embriones de pollo por vía corioalantoica hallan que las Br. abortus y suis tienen especial afinidad por las células mesodérmicas, sobre todo, el en-

dotelio vascular; en cambio, la cepa de Br.mellitensis estudiada sólo desarrolló en el epitelio ectodérmico. DICKEY y FORBUS (9) usando técnicas supravitales encuentran que la Br.suis puesta en contacto con los glóbulos blancos de sujetos normales es rápidamente fagocitada por los polinucleares: "When ingested by a polymorphonuclear leukocyte, brucella was found to be surrounded by a vacuole. The ingested organism was not necessarily killed by the cell; in some instances it appeared to multiply within the cell body". En 1947 RUIZ CASTAÑEDA (10) presenta un interesante estudio experimental sobre la patogenia de la brucellosis. Inocula con los tres tipos de brucellas cobayos y conejos intravenosamente y directamente en el testículo, y pericotes intranasal e intravenosamente. Sacrificando los animales en períodos sucesivos para seguir el proceso de la infección, encuentra entre el 3er. y 5to. día después de la inoculación, en los animales infectados en el testículo, gérmenes intracelulares que lo impresionan como que los parásitos dentro de las células han incrementado no por fagocitosis sino por el desarrollo de colonias después que el organismo ha ingresado al citoplasma. SPINK (11) en 1948 cita las observaciones de BRAUDE quien habría demostrado en cobayos, la invasión de las células hepáticas por la Br.abortus dentro de la primera semana de la infección. En 1949 RUIZ CASTAÑEDA (12) presenta nuevas pruebas de la capacidad de las brucellas de desarrollar intracelularmente: "La inoculación por vía intratesticular o intrahepática de brucellas muertas da motivo a cuadro fagocitarios en que los macrófagos tienden a recoger un número considerable de los gérmenes inyectados. Sin embargo, contrariamente a lo observado en la inoculación de gérmenes vivos no se observan células parenquimatosas conteniendo brucellas". Para fundamentar su opinión de que las brucellas se multiplican intracelularmente, el autor expone: "En los animales inoculados con brucellas vivas la notable escasez de brucellas en zonas donde hay macrófagos completamente llenos al lado de macrófagos vacíos, no puede explicarse por una simple fagocitosis". Además, infiere del hecho de que las brucellas sean viables en los tejidos, que éstas no están pasivamente en el seno protoplasmático.

Todos estos trabajos han dado una sólida evidencia de la capacidad de las brucellas de vivir intracelularmente. En la experiencia que hemos relatado, al haber seguido cuantitativamente la multiplicación de los gérmenes, se ha demostrado experimentalmente este proceso de reproducción en el soma celular.

Sumario

Se hace un estudio de la sucesión de fenómenos desencadenados en el cobayo por la inyección intracutánea de brucellas, dando los caracteres macro y microscópicos escalonados de la reacción.

Se logra demostrar la multiplicación intracelular del germen habiéndose seguido cuantitativamente, día a día, el incremento del número de Brucellas desarrollándose en los macrófagos en el foco inflamatorio. Entre el 9º y 13º día el 100 % de los histiocitos estaban parasitados.

Summary

A systematic study of the reactions elucidated by intracutaneous injections of Brucella mellitensis in the guinea pig is given, with the description of macro and microscopic characteristics. It has been possible to demonstrate the intracelular multiplication of Brucella day by day, developing in the macrophages of inflamatory focus. Between the 9th. and the 13th. day after inoculation 100 % of the macrophages showed the organisms.

Bibliografía

1. Arias Stella, J.: Contribución al conocimiento de la Patología de la Brucellosis. Observaciones Anátomo-Patológicas en casos mortales humanos y estudio patogénico experimental. Tesis de Bachiller. Facultad de Medicina de Lima.
2. Meyer, K. F., Shaw, E. B. and Fleischner, E. C.: The Pathogenicity of Br. mellitensis and Br. abortus for guinea pigs. J. Infect. Dis. *31:* 158, 1922.
3. Smith, T.: The Relation of Bacillus Abortus from Bovine sources to Malta Fever. *J. Exp. Med. 43:* 207, 1926.
4. Zdrodowski, P., Brenn, H. et Woskressenski, B.: Etude Sur la Fievre ondulante en Azerbaidjan. Recherches speciales sur le groupe Brucella Mellitensis-Abortus. Ann. Inst. Pasteur. *45:* 768, 1930.
5. Forbus, W. D.: Reaction to injury. Baltimore. Williams & Wilkins, 1943.
6. Smith, T.: A characteristic locatilzation of Bacillus Abortus in the Bovine fetal Membranes. *J. Exp. Med. 29:* 451, 1919.

7. GOODPASTURE, E. W. and ANDERSON, B. A.: The problem of infection as presented by Bacterial invasion of the chorio-allantoic membrane of chick embryos. *Amn. Jour. Path. 13:* 149, 1937.
8. BUDDINGH, G. and WOMACK, F.: Observations on the infection of chick embryos with Bacterium tularense, Brucella and Pasteurella pestis. *J. Exper. Biol. Med. 64:* 298, 1947.
9. DICKEY, J. W. and FORBUS, W. D.: Chemotactic properties of Brucella suis. A study of Phagocytosis of Brucella in Vitro By normal, Nonirmune Human leucocytes. *Amn. Jour. Path. 21:* 195, 1945.
10. RUIZ CASTAÑEDA, M.: Studies on the Pathogenesis of Brucellosis Proc. *Soc. Exp. Biol. Med. 64:* 298, 1947.
11. SPINK, W. W.: Pathogenesis of human Brucellosis with respect to prevention and treatment. *Ann. Int. Med. 29:* 238, 1948.
12. RUIZ CASTAÑEDA, M.: Notas sobre problemas de Patogenesis de la Brucelosis. *Gacet. Méd.* México. *79:* 7, 1949.

EXPLICACION DE LAS FIGURAS

Lámina I

Fig. 1.—Aspecto macroscópico de la reacción al 13avo. dia.
En A) Se aprecia el nódulo con placa cianótica central, estando a punto de ulcerarse.
En B) Se ve un nódulo que acaba de ulcerarse y otro menos evolucionado.

Fig 2.—Aspecto de la reacción dérmica a las 178 horas. Hay un gran foco central de polinucleares e histiocitos degenerados y se esbozan las bandas de proliferación histiocítica y fibroblástica en la base.

Fig. 3.—Aspecto de la reacción a las 312 horas. El nódulo ha lisado la epidermis y comienza a eliminarse. Las bandas histio-eosinófila e histio-fibroblástica son bien netas. El cuadrado encierra la zona que comprenden estas fajas.

Fig. 4.—Vista a mayor aumento de parte de la zona comprendida en el cuadrado de la figura anterior. Col. Giemsa. Todos los histiocitos muestran brucelas en el proroplasma.

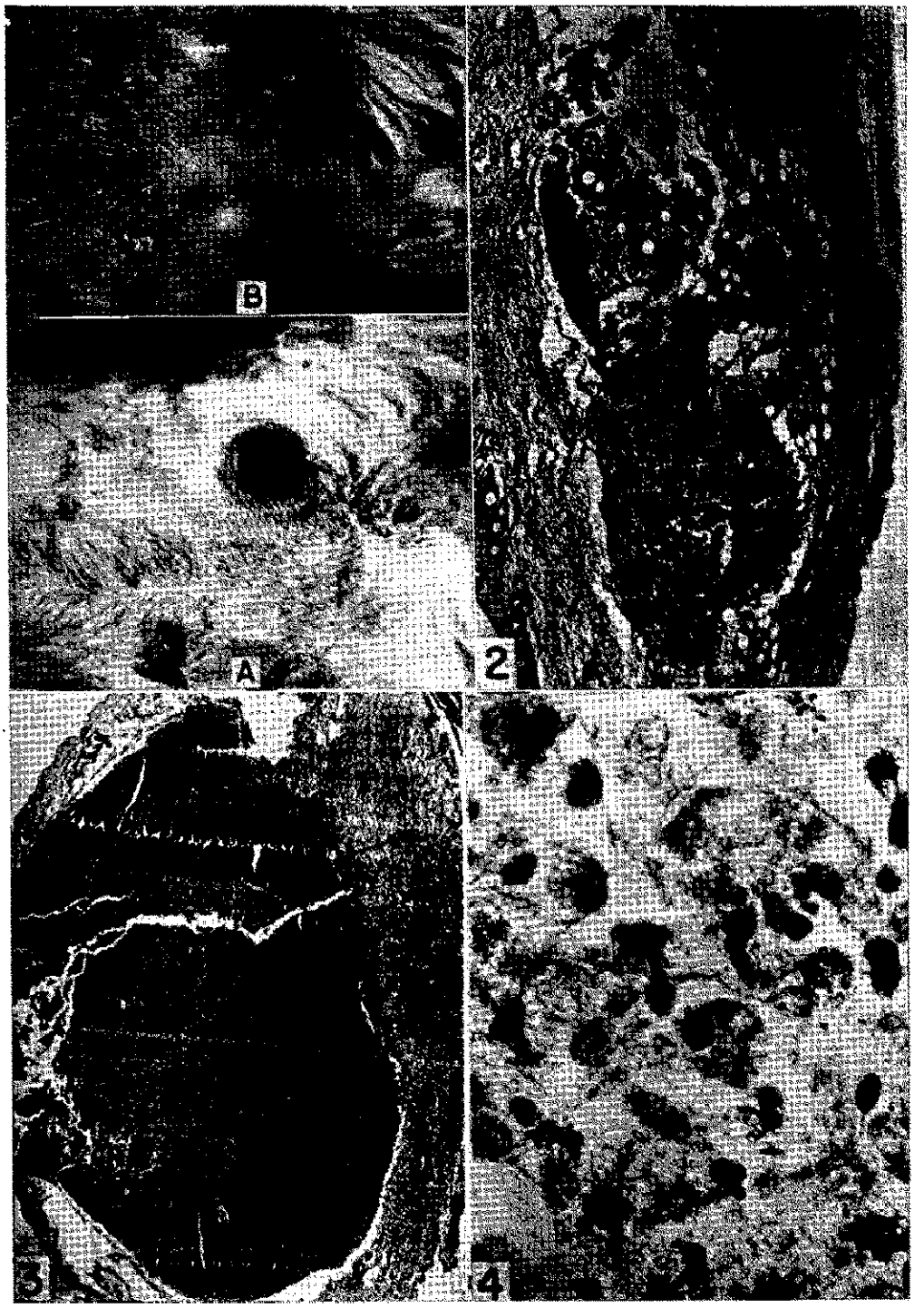

B
A
2
3
4

Lámina II

Fig. 5.—A-Cobayo E-I-7, a las 178 horas. Frotis de biopsia de piel. Col. Giemsa x 1.200. Histiocito con microcolonia en parte del protoplasma y fagocitosis de restos nucleares en la otra.

B-C Cobayo E-I-14, a las 288 horas. Frotis de biopsia de piel. Col. Giemsa, x 1.250. Histiocitos con el protoplasma lleno de brucelas.

Fig. 6.—Cobayo E-I-5, a las 312 horas. Frotis de biopsia de piel. Col. Giemsa x 1.400 (ampliada). Se observa un histiocito totalmente lleno de brucellas y otro, a su lado, con algunas dispersas en el citoplasma. En este período el 100% de los macrófagos muestra brucellas en el protoplasma, viéndose todos los grados del parasitismo entre los extremos que ilustran estas dos células.

Fig. 7.—Cuy E-I-20 a las 240 horas.

Tope de ganglio linfático regional. Célula reticular totalmente llena de brucellas.


5
A
B
C
6
7