

LOS MICROBIOS «INVISIBLES» (1)

Conferencia dada por el Dr. H. Vallée en nuestra Facultad

(Traducción del Dr. Serres)

Los descubrimientos de Pasteur, de Koch y de sus discípulos, parecían, hace algunos años no haber arrancado más que en parte, el secreto de la «virulencia». Después de haber conseguido evidenciar los parásitos del carbúnclo, del muermo, de la tuberculosis, se buscaban en vano los misteriosos agentes de la fiebre aftosa, de la clavelée, de la rabia, pero aún sin conocerlos, no se dudaba de su naturaleza viviente y figurada.

Nuestro espíritu, por el examen de las cosas que nos rodean, está efectivamente, muy preparado para admitir que *deben* existir, al lado de los microbios visibles y cultivables, bien conocidos hoy, otras bacterias de dimensiones infinitamente más reducidas, y tan pequeñas que no es posible ponerlas en evidencia, por medio del microscopio. El reino animal y el reino vegetal, nos facilitan numeroso ejemplos de desproporciones extremas, cuyo conocimiento banal nos prepara á la noción más sutil de desproporciones análogas, posibles entre las tribus microbianas.

De! mismo modo que existen, por relación al hombre, mamíferos gigantes, tales como el elefante, y enanos como la laucha; del mismo modo que conocemos por relación á los árboles, dimensiones medias, el pino gigante de los Andes y el árbol minúsculo del Japón, concebimos que puedan existir por relación á los microbios de proporción mínima, apenas visibles al micros-

(1) Conferencia de Vulgarización.

copio, y á las gruesas bacterias de fácil apreciación, microbios tan pequeños que no pueden ser vistos al microscopio, mientras que ellos traducen sus fechorías por numerosas infecciones temibles y variadas. Merecen ser señaladas diversas constataciones que permiten establecer, en principio, la noción de microbios invisibles, y de hacer ellos, según la hermosa expresión de E. Roux, *seres de razón*.

Al lado de la bacteria gigante de Bütschli, que mide 6 milésimos de milímetro de espesor, y cuyas dimensiones—enormes para un microbio—han permitido el estudio de la estructura de estos parásitos, conocemos microbios que, como el descubierto en la Influenza, por Pfeiffer y el agente de la Coqueluche, estudiado por Bordet, no tienen un ancho mayor de medio milésimo de milímetro.

Estos últimos microbios se encuentran en *el límite de la visibilidad* al microscopio, pues este instrumento cualquiera que sea el aumento empleado, y el valor de su construcción, no permite apreciar la forma particular cuya dimensión es inferior á los cuatro décimos de un milésimo de milímetro. (1)

Luego, según los interesantes trabajos de Errera, si se calcula, teniendo en cuenta el valor de la molécula de albúmina, el peso más débil y las dimensiones más pequeñas que puede tener un ser viviente, reducido como el microbio á su más extrema simplicidad, se constata que los microbios precitados, á penas visibles, representan especies de talla muy apreciable por relación á las que *pueden* existir.

Es permitido, por otra parte, concebir por otras razones, que la de insuficiencia de volumen, un microbio extremadamente pequeño, puede no ser visto al microscopio. Las leyes de la física óptica nos enseñan que no podemos ver y nos permiten comprender porqué no vemos los objetos iluminados de análogo modo, con la misma intensidad que el medio en el cual ellos se presentan á nuestro ojo.

No vemos las estrellas en pleno día porque la atmósfera, tan luminosa como ellas, se opone á su visibilidad, mientras que ellas se nos aparecen maravillosamente durante la noche, á favor de la obscuridad de los espacios celestes.

Del mismo modo, en una habitación iluminada, las partículas de polvo que están en suspensión en el aire, permanecen invi-

(1) Trabajos de Lord Rayleigh.

sibles, pero aparecen netamente en el rayo de sol que atraviesa un rincón oscuro.

Tampoco percibimos los objetos rigurosamente transparentes, y el más hermoso ejemplo de esta particularidad nos es suministrado por nuestro ojo, que ve á través de su córnea, sin que podamos, en tanto que permanece intacta, suponer que ella existe.

Estas nociones corrientes facilitan la comprensión de las particularidades del empleo del microscopio. Mientras que en este instrumento el ojo del observador ignora la presencia de las lentes, si ellas están limpias, y la de los vidrios de la preparación que llevan los microbios que él examina, este ojo ve perfectamente los microbios *coloreados* ó *iluminados* de modo de hacerlos *más* ó *menos* luminosos que el medio que los soporta.

Los que debutan en micrografía, ven con dificultad los microbios no coloreados, del mismo modo que los observadores más avezados no pueden pronunciarse sobre la forma exacta de muy pequeñas bacterias, no coloreadas, fáciles á determinar después de una coloración oportuna. Esta noción de la transparencia de las bacterias vivas, no coloreadas, y de la dificultad de su observación, hace todavía más verosímil la hipótesis de la existencia de microbios invisibles porque son demasiado transparente, ó demasiado pequeños para ser vistos.

Por éso, esta hipótesis debía un día encontrar lugar en la ciencia. Y es á Pasteur y á sus colaboradores Roux y Chamberland, á quienes debemos esta concepción. La demostración de la especificidad de las *bacterias visibles* en los virus del Carbunco bacteridiano y del Cólera de las gallinas acababa de ser suministrada gracias al método de los cultivos en serie, y de las inoculaciones; no encontrándose en el virus de la Rabia, tan fácilmente inoculable, bacterias cultivables ó *visibles* al microscopio, Pasteur y sus colaboradores declaran que, como todos los otros, el virus de la Rabia es función de un microbio, pero que ese microbio es de una variedad especial, puesto que no se le puede cultivar, y que por otra parte, es demasiado pequeño para ser visible al microscopio.

La Peripneumonía contagiosa del buey, ha suministrado durante mucho tiempo, élla también, un ejemplo de estos virus amorfos, rebeldes al cultivo. Pasteur, y después Nocard, demuestran que la serosidad virulenta recogida debajo de la pleura de un pulmón enfermo no encierra más que raras células, ninguna bacteria, y no dá cultivo en los medios comunes.

El microscopio y el cultivo permanecían entonces, impotentes para encontrar *la razón* de todas las virulencias puestas en evidencia por el método de las inoculaciones, y de las cuales cantidades son función de bacterias visibles y cultivables. A esas virulencias correspondían esos *seres de razón* que se calificaban todavía de microbios invisibles, pero cuya naturaleza exacta quedaba por establecer.

Con la experiencia de Löffler y Frosch, esos seres de razón debían transformarse en *seres de realidad*. Esta célebre experiencia, debe con justo título, ser descripta.

En los animales afectados de Fiebre Aftosa, el líquido seroso contenido en las aftas de la boca, recogido desde la formación de estas lesiones, no encierra ningún microbio visible al microscopio, ningún germen cultivable.

Sin embargo, la inoculación de ese líquido, establece su virulencia. Löffler y Frosch diluyen una parte de él, en treinta y nueve partes de agua—y agregan á la dilución, un microbio bien conocido, el *Bacillus fluorescens*. La dilución es filtrada sobre una pared muy porosa de tierra de infusorios: el filtrado obtenido no encierra ninguna bacteria visible ó cultivable, pero inoculado á terneros les comunica una fiebre aftosa típica.

El *virus* aftoso, ha atravesado, pues, el filtro. Desde luego, tres hipótesis pueden ser formuladas: ó el filtro estaba hendidó: ó el virus aftoso es líquido; ó bien es figurado, *sólido*, pero bastante pequeño para atravesar los poros del filtro.

La primera hipótesis, la de una hendidura del filtro, no puede ser sostenida puesto que el *B. fluorescens* ha sido detenido por la filtración, como lo prueban las siembras del filtrado, que quedaron estériles. Si el virus se presenta al estado líquido, debe atravesar *todos* los filtros, aún los más espesos, los menos porosos. Pero la filtración á través de estos filtros *hace perder al líquido* virulento toda su actividad. El agente de la Fiebre Aftosa, es entonces *sólido*, figurado, pero bastante pequeño para atravesar los filtros porosos que retienen á los microbios conocidos y visibles.

No es de extrañar entonces que sea *invisible*!

La demostración de Löffler y Frosch, era demasiado fecunda, demasiado voluminosa, para no arrastrar, todas las convicciones é incitar á los investigadores á reproducirla con diversos virus hasta entonces misteriosos y clasificados, ellos también, entre los que proceden de un microbio invisible.

Diez años han bastado para la tarea, y la lista de las enfermedades microbianas debidas á microbios invisibles y filtrantes, es hoy tan larga que debo limitarme á citar sólo las principales. Son en los animales: la Fiebre Aftosa, la Peripneumonia contagiosa, la Peste bovina, la Peste del caballo, la Peste aviaria, la Clavelée, la Enfermedad de los perros, la Anemia infecciosa del caballo, etc.....; en el hombre y los animales: la Rabia la Vacuna.....; en el hombre, la Fiebre Amarilla, la Viruela.

Los vegetales mismos tienen sus enfermedades de microbios invisibles filtrantes: la lesión tan perjudicial del tabaco, conocida bajo el nombre de mosaico, es inoculable de las hojas enfermas á las hojas sanas y el jugo virulento de la hoja infectada, filtrado sobre pared de porcelana, no pierde nada de su poder infectante!

* * *

Hay lugar de preguntarse si los diversos microbios invisibles y filtrantes ya conocidos, pertenecen todos á la misma categoría de seres vivientes ó bien si provienen, como los microbios visibles al microscopio ó cultivables, sea del reino animal, sea del reino vegetal y de que órdenes de estos reinos.

Caemos aquí por segunda vez, en el campo de la hipótesis y ninguna solución cierta puede ser traída. Es interesante, de todos modos, lanzar una hojeada de conjunto sobre las infecciones debidas á microbios invisibles, á fin de encarar sus puntos comunes, sus diferencias, y compararlos á las enfermedades provocadas por bacterias visibles y cultivables.

Como los microbios visibles, los microbios filtrantes determinan sea infecciones septicémicas (Pestes bovina, aviaria, equina, porcina, etc.), sea infecciones de marcha lenta (anemia del caballo, epiteloma contagioso,).

Ellos provocan en el organismo resistente, reacciones especiales que dan lugar á la aparición de un parasitismo latente (Anemia del caballo, Fiebre Aftosa) análogo al que se observa á consecuencia de infecciones provocadas por parásitos visibles (Sífilis, Piroplasmosis). Muchos de ellos determinan reacciones de inmunidad de todo punto comparables á las conocidas para las enfermedades bacterianas, y suministran *sueros inmunizantes* de valor real (Fiebre Aftosa: Löffler, Roux, Nocard, Carré y

Vallée; Peste bovina: Nicolle y Adil; Clavelée, Borrel, etc.....) susceptible de dar por asociación al virus correspondiente, *sueros-vacunas* eficaces (Peste bovina, Nicolle; Clavelée, Borrel; Peste porcina, Borset Bolton y Mc-Bryde, etc.).

En cuanto á su resistencia á los agentes de destrucción, tales como el aire y la luz, ciertos microbios filtrantes atestiguan una hermosa defensa (Rabia, Peste del caballo, ...) mientras que otros son de una real fragilidad (Fiebre Aftosa) y aún bajo este punto de vista, los microbios filtrantes son comparables á los microbios visibles.

Por el contrario, cualidades de importancia capital distinguen á los microbios invisibles de sus congéneres palpables. Mientras que las bacterias cultivables y visibles son inoculables á otras especies animales que las que son *naturalmente* afectadas, los microbios invisibles no aparecen, en general, virulentos, patógenos para otras especies que aquellas á las cuales ellos infectan espontáneamente.

Así, mientras que la bacteria del Carbunco se inocula á la maravilla, al cobayo, al conejo, y en ciertas condiciones á la gallina, que no contraen el Carbunco naturalmente, no se acierta á inocular la Anemia del caballo á otras especies; la Peste porcina, al buey; la Peste del caballo, al perro, etc., etc.

Además, la vida saprofítica, fuera del organismo vivo, que se observa para ciertos microbios cultivables tales como la bacteria carbunclosa, el coli-bacilo, el bacilo del Rouget, etc. . . . , no parece posible para los microbios invisibles, los cuales parecen ser *parásitos de necesidad*, completamente adaptados á los organismos y estrechamente especializados.

Es tal vez en esta adaptación estrecha que hay que buscar las razones del fracaso de las tentativas de cultivos, fuera del organismo de los microbios invisibles. Cada uno sabe que es extremadamente fácil, gracias á los métodos introducidos en la ciencia por Pasteur y por R. Koch, obtener el desarrollo de los diversos microbios visibles, sobre medios puramente artificiales, fuera del organismo viviente.

Sin embargo, esos métodos que proporcionan éxitos brillantes con los microbios visibles, los menos completamente adaptados al parasitismo, tales como la bacteridia carbunclosa, el coli-bacilo, etcétera, se muestran menos fructuosos con las bacterias visibles ya muy adaptadas, como los bacilos de la Tuberculosis y de la Lepra.

Ellos fracasan completamente con los microbios invisibles, adaptados todos muy estrechamente á la vida parasitaria, y está particularidad de inaptitud al cultivo servía en otros tiempos para caracterizarlos, antes de que se supiese ponerlos en evidencia por la filtración (Rabia, Peripneumonía, Fiebre Afetosa,).

* * *

Sería, sin embargo, de la mayor importancia obtener su cultivo artificial, representando éste—para muchos de ellos—la condición esencial del éxito de los estudios continuados con el objeto de remediar los daños que provocan.

Hasta la fecha, desgraciadamente, á pesar de los más encomiables y multiples esfuerzos, no sabemos cultivar más que una sola de las numerosas especies conocidas de microbios invisibles, y es á Nocard y Roux á quienes la Ciencia es deudora de esta hermosa conquista: la del cultivo del microbio de la Peripneumonía contagiosa.

Hay que notar inmediatamente que esta dificultad solo ha sido vencida teniendo en cuenta las condiciones de la adaptación estrecha del microbio á la vida parasitaria.

También, es gracias á su maravilloso procedimiento de cultivo *en el organismo* que Nocard y Roux, han podido solucionar el problema que estudiaban.

Estos sabios han realizado de la manera siguiente la transición que debía conducir á la aptitud al cultivo artificial, á un microbio estrechamente acostumbrado al organismo viviente: sacos de colodion llenados con caldo nutritivo sembrado con un vestigio de virus peripneumónico puro, son introducidos durante quince días, en la cavidad peritoneal de un conejo ó de un buey. Efectúanse cambios osmóticos entre el líquido peritoneal y el contenido del saco, el cual progresivamente toma las cualidades de un medio orgánico viviente, mientras que la pared de colodion limita el campo de cultivo y se opone á la infección.

Después de quince días, el contenido del saco, de límpido que estaba, se ha transformado en turbio; se presenta virulento para el buey, aún después de extrema dilución ó de «repiquages» sucesivos de saco en saco; encierra entonces un cultivo del micro-

bio peripneumónico, obtenido mediante la realización de un medio artificial que se acerque lo más posible á la constitución humoral normal del organismo.

Esta primera adaptación habiéndose realizado, se hace posible obtener el cultivo á fuera del organismo, del microbio rebelde á los medios ordinarios artificiales, con la simple condición de agregar un poco de suero de buey, á los medios empleados.

Examinado al microscópio, el cultivo del microbio hasta entonces invisible de la peripneumonia, se revela constituido por innumerables granulaciones tan pequeñas que no es posible, aún con la ayuda de los más poderosos aumentos, pronunciarse respecto á su forma. Si bien ya no era rigurosamente invisible, el microbio quedaba todavía, de apreciación descriptiva imposible!

Algunos años más tarde, gracias al conocimiento de un nuevo aparato, el ultra microscopio, se podía esperar de entrever con mayor precisión al misterioso agente.

El ultra microscopio ofrece la ventaja de revelar al observador, partículas de un diámetro de algunos millonésimos de milímetros tan sólo, mientras que el microscopio, como ya lo he dicho hace un instante, no puede descubrir objetos inferiores á 4 décimos de micrón. El principio de este aparato que se debe á Liedentopf y Zsigmondy, reside en un modo especial de aclaración de las preparaciones á examinar, las cuales son iluminadas por rayos luminosos que las atraviesan *perpendicularmente* al eje óptico del aparato; el microscopio normal, por el contrario, es aclarado por rayos paralelos á ese eje, todos los cuales llegan al ojo observador.

Resulta de esta disposición que tiene el ultra microscopio, que el operador ve los microbios *solos* iluminados sobre un fondo oscuro, mientras que en el microscopio, los microbios y el fondo están igualmente á la luz. Esta particularidad y los hechos expuestos al comienzo de esta conferencia, permiten comprender porque con el ultra-microscopio, el ojo percibe partículas extremadamente finas que quedarían ignoradas con el microscopio normal.

El estudio de los cultivos del microbio de la peripneumonia con el ultra-microscopio, no proporciona, sin embargo, más que resultados insuficientes y desilusiones. Estos cultivos dan en el aparato formas microbianas en puntos aislados, en diplococos, en agrupamientos variados, de interpretación difícil y sin valor demostrativo real.

Infinitamente más interesantes para el estudio del microbio, son los procedimientos de sobre coloración debidos á Borrel y la técnica de coloración de Bordet. El teñido de los microbios por ciertos procedimientos enérgicos, previos lavajes, ofrece, en efecto, la ventaja de provocar por depósitos sucesivos de color en la superficie del germen, y por efecto óptico, un acrecentamiento real ó ilusorio, pero uniforme, de las dimensiones de éste.

Es por éso, que el exámen microscópico normal, con la ayuda de aumentos muy poderosos, de cultivos puros del microbio de la peripneumonia permite obtener nociones exactas sobre la morfología de este agente de un interés tãan real. Y de este modo, Borrel y sus colaboradores han podido establecer que el microbio de la peripneumonia, de apariencias misteriosas, no es de ningùn modo esencialmente diferente de agentes ya conocidos, pero que él ofrece, no obstante, particularidades muy interesantes: de un polimorfismo extraordinario, él proporciona diplococos, tetrágenos, filamentos, ahogados en una ganga viscosa y merece el nombre de «*Asterococcus mycoides*».

He aquí, pues, clasificado y estudiado, el primero y hasta entonces, el único cultivo, de los microbios filtrantes, y fijada también esta noción—que no hay microbios *invisibles*, pero que había y se encuentran todavía microbios *no vistos* por insuficiencia de nuestras técnicas.

Borrel y sus colaboradores, en sus hermosos trabajos sobre la Clavelé, la Viruela, la Vacuna, han reconocido, por coloración de los cortes microscópicos de los órganos alterados, en las células variolosas, clavelosas, formas especiales muy vecinas de las observadas en los cultivos del microbio de la peripneumonia. Desde luego, estas infecciones son también debidas á microbios filtrantes y esas constataciones permiten vislumbrar nuevas soluciones á estas cuestiones que han quedado tan oscuras.

Cualquiera que sea el porvenir reservado á la ciencia en estas materias, no se puede poner en duda que la noción de los microbios invisibles abre á nuestras indagaciones campos fecundos de investigaciones inéditas. Desde ya estamos autorizados á pensar que ciertas infecciones ignoradas en sus razones, tales como la Rougeole, la Escarlatina, y la Grippe, proceden de microbios llamados invisibles, y la cuestión tan agitada

del Cáncer, puede élla también beneficiar de estas mismas concepciones.

Sabemos ya, por los trabajos de Marx y Sticker, que existe en los pájaros un epiteloma inoculable debido á un virus filtrante; notamos también desde Borrel, las profundas analogías del cáncer y de ciertas lesiones clavelosas provocadas por un microbio invisible.

Estos hechos y lo que sabemos de la resistencia casi absoluta de la mayor parte de las especies animales á la inoculación de los virus filtrantes tomados de especies diferentes, noción paralela á la de la no-inoculabilidad del cáncer, entre animales diversos, son indicaciones en las cuales puede inspirarse la ciencia y que á falta de soluciones definitivas sirvan para enriquecer la pobre historia de esta terrible enfermedad.

El descubrimiento de los microbios invisibles representa entonces una de las más curiosas adquisiciones de la bacteriología, y también una de las más fructuosas, pues se puede afirmar que el conocimiento de los agentes de una infección es el prefacio inevitable del éxito en la terapéutica ó la profilaxia de las enfermedades infecciosas.