

LA ETIOLOGIA DEL ANTRAX BASADA EN LA HISTORIA NATURAL DEL *BACILLUS ANTHRACIS**

Robert Koch

INTRODUCCION

Desde el descubrimiento de formas bacillares en la sangre de animales que mueren de Antrax se han hecho muchos esfuerzos para probar que esos bacilos son responsables de la transmisibilidad así como de su aparición esporádica. Estos estudios han tratado de determinar si los bacilos son el único material contagioso en el Antrax. Recientemente Davaine ha realizado varios experimentos de inoculación con sangre fresca y desecada que contiene los bacilos y ha afirmado decididamente que estos bacilos son bacterias y que sólo en presencia de estas bacterias puede producirse un caso nuevo de Antrax. La carencia de pruebas de la transmisión directa del Antrax en el hombre y en los animales es debida a la capacidad de la bacteria para sobrevivir largos períodos en condiciones de desecación y para ser transmitida por el aire, los insectos, y demás. Parece así que el modo de transmisión del Antrax ha sido explicado.

No obstante las ideas de Davaine han encontrado mucha oposición. Muchos investigadores han encontrado Antrax expe-

rientalmente inoculando sangre que contiene las bacterias, pero han sido incapaces de demostrar la presencia de las bacterias en la sangre de los animales enfermos. Otros pudieron inducir Antrax por inoculación de sangre en la que no se demostraban las bacterias pero los animales enfermos sí tenían bacterias en su sangre. Otros han notado que el Antrax no sólo se deriva de algo contagioso que se transmite por encima del suelo, sino que la enfermedad está, de alguna manera, relacionada con las condiciones del suelo.

Estas experiencias no pueden ser explicadas por la hipótesis de Davaine y, debido a ello, muchos creen que las bacterias no son significativas en el Antrax.

Dado que he tenido la oportunidad de examinar varias veces animales muertos de Antrax, llevé a cabo experimentos para esclarecer las incertidumbres sobre la etiología del Antrax. De esta manera concluí que la teoría de Davaine sobre la transmisión del Antrax solo es parcialmente correcta. Pude mostrar que los bacilos en la sangre en el Antrax no eran tan resistentes como Davaine había creído. Más tarde mostrare que la sangre que contiene sólo bacilos, mantiene su capacidad para inducir Antrax por inoculación sólo unas pocas semanas en el estado seco y sólo unos pocos días si está húmeda. Cómo es posible, entonces, que un organismo fácilmente destruido se mantenga como contagio latente por un año en el suelo y a

* Traducción del Dr. Federico Díaz González, profesor titular Fac. de Medicina, Univ. de Antioquia, especialmente para la REVISTA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, con la autorización de la American Society for Microbiology, editora del libro "Milestones in Microbiology".

través del Invierno?. Si las bacterias son realmente causa del Antrax debemos postular que sufren un cambio y asumen una situación resistente a las alternativas de sequedad y humedad. Lo que es más probable y ha sido ya indicado por el Profesor Cohn es que las bacterias pueden formar esporos con capacidad para volver a dar la bacteria después de un periodo de reposo más o menos largo.

Todos mis experimentos estuvieron diseñados para descubrir esta etapa de desarrollo de la bacteria del Antrax. Después de muchos fracasos pude finalmente lograr esa meta y hallar así una base para la etiología del Antrax.

Puesto que la historia natural de la bacteria del Antrax ofrece Interés no sólo botánica sino que también arroja mucha luz sobre la etiología, hasta ahora incierta, de las enfermedades infecciosas relacionadas con el suelo, publico ahora mis resultados más importantes aunque mi trabajo todavía está en curso.

II. Historia natural del *Bacillus anthracis*

No se ha podido observar la multiplicación de la bacteria directamente en el animal, pero puede inferirse que ocurre de los siguientes experimentos de Inoculación. He usado el ratón como animal experimental porque es sencillo de emplear... En la mayoría de los experimentos los inoculé en la base de la cola donde la piel es laxa y cubierta con pelo largo; de esta forma he hecho muchas Inoculaciones usando material fresco de Antrax y en todos los casos he tenido resultados positivos; creo por lo tanto, que el resultado de la Inoculación puede usarse como indicativo de la vida o muerte de los bacilos Inoculados. Luego demostraré que esta idea es cierta.

En parte para tener siempre disponible material fresco y en parte para descubrir si los bacilos cambian a otra forma despues de cierto número de generaciones, inoculé series de ratones, la una a partir de la otra, empleando cada vez un ratón que acababa de morir como fuente de material esplénico. La serie más grande de ratones tratados en esta forma fue de veinte, que por tanto representan otras tantas generaciones de

bacilos*. En todos los animales los resultados fueron iguales. El bazo estaba muy hinchado y contenía un número grande de bacilos transparentes, de apariencia muy similar, inmóviles y sin esporos. Ese mismo tipo de bacilos se podía hallar también en la sangre pero no en cantidad tan grande como en el bazo. En estos experimento se mostró por lo tanto, que un número pequeño de bacilos podía siempre desarrollarse a una masa significativa de individuos del mismo tipo... que parecían reproducirse creciendo en longitud y partiéndose después de alcanzar dos veces la longitud del bacilo individual. Estos resultados también indican que es muy improbable que los bacilos sufran algún cambio de forma en una serie mayor de Inoculaciones y, por lo tanto, es improbable que llegue a ocurrir alguna alteración de generaciones...

Nos llevaría muy lejos considerar si o no la causa real de la muerte de los animales es la producción de hidróxido de carbono en la sangre por el crecimiento rápido de los bacilos en ella o, la que parece más probable, que la muerte se deba a un producto metabólico del parásito al utilizar proteínas como nutrientes y que tal producto sea venenoso para el animal**.

Para estudiar la historia natural de los bacilos por fuera del animal se colocó una gota de suero fresco de bovino o de humor acuoso del ojo de una vaca en un portaobjetos. Después se colocó en la gota un fragmento pequeño de bazo que contenía las bacterias y que había sido recién removido de un animal Infectado. Se cubrió con una laminilla, se metió en una cámara húmeda para que el líquido no se evaporara y se puso todo en una Incubadora a 35-37°C por 15 a 20 horas; al cabo de este tiempo podían verse, entre las células, muchos bacilos inalterados, aunque su número era menor que en las preparaciones en fresco. Sin embargo en el líquido, fuera de los tejidos, podían verse bacilos 3 a 8 veces más largos que mostraban ángulos y curvaturas. Mientras más cerca al borde del cubreobje-

* Hoy sabemos que el número de generaciones bacterianas sería mucho mayor que veinte.

** Tal producto metabólico, hoy llamado toxina, está usualmente asociado de algún modo con la mayoría de las enfermedades infecciosas, incluso el Antrax..

los más largos los filamentos que finalmente alcanzaban cien o más veces la longitud del bacilo original. Muchos de estos filamentos largos habían perdido su estructura uniforme y su apariencia transparente y su contenido se había vuelto finamente granular. Los filamentos que estaban al borde mismo del cubreobjetos, donde era mejor el intercambio de gas, mostraban el desarrollo más extenso. Contenían esporos completamente formados, embebidos en la sustancia de los filamentos a distancias regulares; eran algo ovoides y fuertemente refringentes. En este estado los filamentos se asemejaban a un collar de perlas.

Muchos filamentos ya habían perdido sus esporos que podían verse como pequeños acumulos libres. En preparaciones favorables, es posible ver todas las etapas desde bacilos cortos pasando por filamentos en esporulación hasta esporos libres y esto prueba que los últimos surgen de los primeros... (como los esporos parecían formarse más frecuentemente en el borde, se le ocurrió a Koch que tal vez no provenían del bacilo sino de una contaminación a partir del aire, ya que sus preparaciones no eran puras y ocasionalmente había observado otros tipos de bacterias, por eso decidió que la única forma de estar seguro sería observar cuándo tenía lugar la formación del esporo).

Aunque yo había imaginado que tal experimento sería difícil de llevar a cabo en realidad fue muy simple... (Las preparaciones fueron dispuestas de tal modo que pudieran ser examinadas microscópicamente mientras eran incubadas).

Observaciones cada 10 a 20 minutos revelaron que al comienzo los bacilos eran más gruesos, parecían hinchados y casi no mostraban cambios en las primeras dos horas. Después empezaron a crecer. A las 3 a 4 horas se habían alargado 10 a 20 veces; empezaron a curvarse, a empujarse y cruzarse y formaron una red. Después de algunas horas más los filamentos eran tan largos que cubrían varios campos microscópicos...

Si se observaba continuamente por 15 a 20 minutos el extremo libre de un filamento era muy fácil notar su alargamiento y percibir el espectáculo notorio de ver

realmente el bacilo crecer. Era por tanto posible obtener evidencia directa del desarrollo adicional de estos filamentos. Despues de sólo 15 a 20 minutos el contenido de los filamentos más fuertes y que estaban creciendo más exuberantemente era finamente granular y pronto los pequeños gránulos refringentes se fragmentaban en una secuencia regular. Estos fragmentos se agrandaban en el espacio de varias horas más dando los esporos ovoides y refringentes. Gradualmente los filamentos se desintegran, se fragmentaban en los extremos y los esporos quedaban libres... En este estado las preparaciones podían permanecer semanas sin cambiar...

Se hicieron observaciones para obtener un cuadro completo de la historia natural del *Bacillus anthracis* y para descubrir si los esporos pasaban por alguna forma intermedia o directamente a un bacilo. Con el fin de hacer esto era necesario descubrir condiciones que permitieran al esporo transformarse en un bacilo y que se pudiera observar directamente al microscopio.

Todos los esfuerzos para obtener desarrollo adicional de los esporos en agua destilada o de pozo fallaron. En suero o humor acuoso los resultados fueron equívocos; sin duda se desarrollaron bacilos que formaron filamentos y esporos pero en pequeño número y no fue posible observar la transformación de esporos aislados en bacilos. Finalmente logré un procedimiento exitoso. Se emplearon preparaciones que bajo el microscopio revelaban sólo un cultivo puro de *Bacillus anthracis* y que contenían principalmente masas de esporos libres. Se dejaron secar los esporos en un cubreobjetos y luego se colocó una gota de humor acuoso en un portaobjetos y el cubreobjetos se puso sobre la gota de modo que la masa de esporos fuera empapada en el fluido. Estas preparaciones fueron colocadas en cámara húmeda e incubadas a 35°C. Despues de 3-4 horas pudo verse el desarrollo de los esporos...

Examinado cuidadosamente con gran aumento parecía que cada esporo era ovoide y estaba embebido en una masa redonda y transparente que semejaba un pequeño anillo de luz alrededor del esporo. La forma esférica de tal anillo podía verse fácilmente rotando el esporo en varias posiciones. Este

material perdía primero su forma esférica, se alargaba en un lado en dirección del eje mayor y se volvía un ovoide largo. El esporo quedaba en uno de los polos del cuerpo de forma cilíndrica. Pronto la cubierta transparente se volvía más larga y filamentososa y, al mismo tiempo, el esporo empezaba a perder sus características fuertemente refringentes. Rápidamente se volvía pálido y más pequeño, se desintegraban en múltiples fragmentos y finalmente desaparecía por completo.

Más tarde pude observar en la misma preparación y en la misma gota de humor acuoso la aparición de bacilos a partir de los esporos y, más tarde, una segunda generación de filamentos que contenían esporos.

Puede asumirse que cuando estos esporos llegan al torrente sanguíneo del animal sensible se produce una nueva generación de bacilos. Para probar esta hipótesis se hicieron los siguientes experimentos...

Inoculando ratones con material rico en esporos o con material con pocos esporos se descubrió que, con muchos esporos los ratones morían después de 24 horas mientras que con pocos esporos no morían de Antrax hasta después de 3 o 4 días. He repetido estos experimentos muchas veces. Las sustancias que contienen esporos se desecaron y dejaron así por un tiempo. Cuando se las humedeció con agua y se las inyectó no habían perdido su capacidad para producir Antrax...

Por otra parte, he inoculado ratones con masas de esporos que provenían de cultivos completamente puros de *Bacillus anthracis* y cada vez los animales inoculados murieron de Antrax*. Se concluye, por lo tanto, que sólo una especie de *Bacillus* es capaz de causar esta enfermedad específica mientras que otros esquizofítos no tienen efectos o causan enfermedades diferentes.

Comentario de los Editores:

Esta fue la primera prueba de que un microorganismo específico podía causar

una enfermedad específica en un animal y aunque la prueba no fue perfecta si fue suficiente para muchos. Este trabajo es mucho más notorio si se recuerda que Koch era un simple médico rural sin entrenamiento formal en investigación. No está claro qué lo motivó a trabajar con Antrax pero la escogencia fue bastante fortuita. La enfermedad es más frecuente en animales que en seres humanos y produce síntomas característicos. El microorganismo puede ser transferido fácilmente al ratón por inoculación y esto hizo posible que Koch estudiara la enfermedad en el laboratorio.

Esto es muy importante porque el estudio de laboratorio puede efectuarse bajo condiciones reproducibles y evita las complicaciones que plagaron a Semmelweis y Lister. El organismo causal del Antrax es un bacilo muy grande que se ve fácilmente al microscopio. En los animales Infectados hay gran cantidad de bacilos en el torrente circulatorio, suficiente para verlos al examen directo de la sangre. El organismo tiene una morfología muy característica haciendo que la identificación microscópica sea razonablemente cierta; además forma esporos. La observación por Koch de estos esporos y del desarrollo de los esporos a partir de los bacilos y de los bacilos a partir de los esporos es importante en bacteriología básica. Confirmó bellamente el Trabajo de Cohn e Indicó la importancia médica de los microorganismos esporulados. Esto fue especialmente notorio dado que Cohn había mostrado que los esporos bacterianos eran altamente termorresistentes. Finalmente, las observaciones de Koch fueron tan cabales y seguras que su trabajo ha permanecido completamente válido hasta el presente. El éxito de su trabajo llamó la atención del mundo médico alemán. Pronto recibió la oportunidad de trasladarse a Berlín donde se le dieron facilidades adecuadas para avanzar su labor. Sus descubrimientos más importantes aún estaban por venir.

Referencia

KOCH, R. The etiology of antrax, based on the life history of *Bacillus anthracis*. Thomas BROCK, Ed. Milestones in Microbiology, American Society for Microbiology, Washington, 1975. pp. 89-95.

* No es del todo seguro que Koch tuviera en esa época, un cultivo puro.