

DIRECTOR

Prof. DARIO CADENA M.

Decano de la Facultad

COMITE DE REDACCION

Prof. Luis Patiño-Camargo

Prof. Jorge Bejarano

Prof. Santiago Triana Cortés

Instituto Federico Lleras Acosta. — Sección de Microbiología.

MYCOBACTERIACEAS EN RESTOS CADAVERICOS*Por Guillermo Muñoz Rivas.*

Desde hace varios años nos hemos ocupado en hacer algunos estudios sobre la flora bacteriana ácido-alcohol resistente de nuestro medio ambiente, porque consideramos de capital importancia conocer suficientemente la biología de estos gérmenes, sobre muchos de los cuales se han verificado interesantes trabajos en otros países, pero que entre nosotros han sido relativamente poco estudiados. Nuestro principal interés estriba en el estudio del bacilo de la lepra y como por tanto tenemos necesidad de practicar siembras con material leproso en medios de cultivos apropiados al desarrollo del género *Mycobacterium*, es lógico que se pueda presentar el crecimiento de bacterias que en algún momento ofusquen el criterio del investigador.

Rodríguez de Souza (*) ha practicado un interesante estudio sobre formas bacilares ácido alcohol resistentes que pueden ponerse de manifiesto microscópicamente en los restos cadavéricos. Los ha encontrado sobre 19 huesos de leprosos exhumados, como también en algunos de los restos de sanos de lepra al morir. Asimismo, dice haberlos visto en los restos de dos perros. En la monografía a que hacemos referencia el autor describe las formas bacilares como muy parecidas a las de los bacilos de Koch y Hansen, hace notar que en varias ocasiones la agrupación en globias recuerda más al segundo.

El material de trabajo ha sido retirado de los huesos y coloreado por la técnica de Ziehl. No puede decir si los bacilos hallados en los restos de leprosos son los de Hansen o por el contrario los mismos que se hallan en casi todos los restos óseos. Para terminar recuerda las teorías de Walker, Manalang y Wladimiroff sobre el

(*) Rodríguez de Souza Argemiro —sobre el Bacilo Ácido-resistente dos cadáveres—. Rev. Bras. Lep. 1937. pág. 501.

ciclo evolutivo del bacilo de la lepra y se pregunta si éste no se desarrollará en el cadáver, existiendo la acción de otras bacterias sobre los tejidos muertos.

En el texto de bacteriología de Dopter y Sacquepée (*) se encuentra una breve referencia sobre bacilos ácido resistentes en los cadáveres; es de lamentar que no precise si se trata de hallazgos hechos al morir, durante el estado de putrefacción o en los restos mortales.

Antes de escribir estas notas informativas hemos buscado mucho en la bibliografía de que podíamos disponer, con el objeto de documentarnos debidamente en relación con este interesante aspecto de la biología de las bacterias ácido resistentes. Los esfuerzos fueron vanos y de ahí que hayamos resuelto comunicar nuestros hallazgos.

Los estudios relacionados con la contaminación de las larvas de pulgas, *P. irritans* y *Ct. canis* hallados en las habitaciones de los enfermos, de lepra, con bacilos morfológicamente idénticos al *N. leprae* (Hansen), fijaron desde luego nuestra atención al suelo, llegando por esta vía al sitio que condujo el estudio de la bacteriología de la lepra a autores como Walker, quien deduce de los trabajos practicados por él en Honolulu, su teoría sobre la fijación del germen de la lepra al suelo. Además, los medulocultivos practicados en el Instituto Federico Lleras Acosta, que han dado resultados positivos para bacilos ácido-alcohol-resistentes, los primeros practicados por Chala y Lleras Restrepo (*) y otros por Chala y nosotros, nos estimularon a interesarnos por las posibles transformaciones que el bacilo de Hansen sufriera en los cadáveres leprosos al ser inhumados.

Nuestras investigaciones se iniciaron en el leprocomio de Agua de Dios y aunque por la bibliografía a que hemos hecho anteriormente referencia teníamos noticia de los hallazgos microscópicos, nos interesaban de manera especial las posibilidades de cultivo y en caso positivo las especies de bacterias aisladas.

Agua de Dios, el más grande leprocomio de nuestro país, se encuentra en el Departamento de Cundinamarca; su temperatura media es de 28,5° C. y su humedad relativa de 76,6%. Del cementerio del citado leprocomio fueron exhumados varios restos. El examen microscópico directo de éstos o de los sedimentos sembrados, fue positivo para bacilos ácido-resistentes.

Para los ensayos de cultivo escogemos ordinariamente la cabeza del femur y practicamos siempre la siguiente técnica:

(*) Dopter et Sacquepée. Bacteriologie. pág. 900.

(* Chala H. J. I., Brumpt L. y Lleras Restrepo F. Punción de la médula ósea en la Lepra. Rev. Colombiana de Lepr. 1940, N° 4. pág. 255.

1º Raspar externamente los detritus adheridos y limpiar con una gasa estéril.

2º Con sierra o con tijera grande damos cuatro cortes paralelos, dos en sentido vertical y dos en el horizontal, para obtener así, un cubo óseo de medio centímetro de lado.

3º Molido prolongado del cubo obtenido. El polvo resultante se trata por el ácido sulfúrico al 10% (en volumen) por media hora.

4º Centrifugar por cinco minutos, lavar una vez con solución salina estéril y sembrar en el medio de Loewenstein con verde malaquita. (Como el material sembrado es muy rico en gérmenes banales, aumentamos en un 0,25 por mil la concentración ordinaria del verde malaquita).

Los resultados de los ensayos de Agua de Dios se condensan en el cuadro Nº 1.

CUADRO Nº 1

Trabajos practicados con restos de leprosos exhumados del cementerio de AGUA DE DIOS

Nombre	Fecha de inhumación	Examen microscópico	Resultado del cultivo	Nº de tubos sembrados
M. R.	1938	P. +++	POSITIVO	10
M. del C. B.	1932	P. +++	POSITIVO	10
A. T.	1913	P. ++	POSITIVO	10
M. I.	1919	P. +++	POSITIVO	10
J. F.	1911	P. ++	POSITIVO	10
E. O.	1907	P. +++	POSITIVO	10
E. C.	1896	P. ++	POSITIVO	10

Fecha de exhumación: Enero de 1942.

Los huesos de estos ensayos eran todos de procedencia leprosa y llama enormemente la atención que en huesos de 46 años de inhumados se obtengan resultados similares a los de cuatro años. Los bacilos encontrados al examen microscópico son francamente ácido alcohol-acetona resistentes, su morfología recuerda el bacilo de la lepra, aun cuando debemos anotar, que así como se encuentran formas delgadas y muy bien agrupadas, se ven también formas gruesas, cocoides y diplococoides; junto con estos gérmenes se aprecia una gran flora bacteriana en la que frecuentemente se ponen de manifiesto gérmenes de tipo actinomicetal. Como se ve en el cuadro, todos los huesos dieron cultivo positivo para bacilos ácido-alcohol-acetona-resistentes. Dichos cultivos se iniciaron positivos entre los 14 y los 28 días de sembrados, habiéndolos incubado a 37° C. en tubos tapados con corchos. De estos intentos de cultivo aislamos

tres especies de bacilos; dos no cromógenas cuyas formas eugónicas son rugosas (R) y la tercera que solamente prendió en un tubo y cuya forma eugónica se presenta como lisa cromógena (S. Ch.)

Como nuestros estudios relacionados con el papel que las pulgas puedan desempeñar en la transmisión de la lepra nos obligan a visitar otros leprocomios, tuvimos oportunidad de repetir los trabajos con huesos de leprosos inhumados en otros climas.

En Caño de Loro, Leprocomio situado en el Departamento de Bolívar, con una temperatura media de 28° C. y una humedad relativa de 85%, se examinaron dos restos de leprosos, con resultados positivos tanto al examen directo como en los cultivos. Los bacilos aislados son igualmente anacromógenos y de forma rugosa, fácilmente disociables en variantes lisas y rugosas.

CUADRO N° 2.

Trabajos practicados con restos de leprosos exhumados del cementerio de CAÑO DE LORO

Nombre	Fecha de	Examen mi-	Resultado	N° de tubos
inhumación		croscópico	del cultivo	sembrados
M. R.	1933	P. ++	POSITIVO	10
D. V.	1938	P. ++	POSITIVO	10

Fecha de exhumación: Febrero de 1942.

Las siembras de estos huesos se efectuaron 20 días después de exhumación y la aparición de las colonias como en los casos anteriores tuvo lugar entre los 14 y los 20 días en iguales condiciones de incubación.

Posteriormente en el Leprocomio de Contratación, situado en el Departamento de Santander con una temperatura media de 20,3° C. y una humedad relativa de 80,6%, se examinaron cuatro restos más, en los cuales aunque el examen directo dio positivo en los cuatro, solamente obtuvimos cultivo positivo en dos; aislando tres especies; dos rugosas no cromógenas y otra lisa cromógena.

CUADRO N° 3.

Trabajos practicados con restos de leprosos exhumados del cementerio de CONTRATACION

Nombre	Fecha de	Examen mi-	Resultado	N° de tubos
	inhumación	croscópico	del cultivo	sembrados
J. L.	1936	P. ++	POSITIVO	10
A. F.	1935	P. ++	POSITIVO	10
D. L.	1939	P. +	NEGATIVO	10
J. P.	1936	P. +	NEGATIVO	10

Fecha de exhumación: Julio de 1942.

Dada la cantidad de resultados positivos en los cultivos de huesos leprosos, solicitamos en Bogotá, del Director del Cementerio un envío de varios fémures cuando practicaran exhumaciones; pocos días después nos fueron enviados 11 huesos de presuntos sanos de lepra, inhumados en bóvedas. Los resultados se hallan en el cuadro número 4.

Debemos anotar que la manipulación, corte y molido de los huesos presuntamente sanos de lepra se hace más difícil. El hueso del leproso se puede trabajar con suma facilidad debido seguramente a las alteraciones óseas que en vida produce la lepra.

CUADRO N° 4.

Trabajos practicados con restos de presuntos sanos de lepra exhumados en el cementerio de BOGOTÁ

Nombre	Fecha de inhumación	N° de la licencia	Examen microscópico	Resultado del cultivo	N° de tubos sembrados
C. de V. D.	1936	29	P. +++	POSITIVO	10
D. de G. E.	1936	420	P. +++	POSITIVO	10
B. A.	1936	256	P. +++	POSITIVO	10
L. M.	1936	290	P. +++	POSITIVO	10
O. L.	1936	129	P. +++	POSITIVO	10
S. E.	1936	16	P. +++	POSITIVO	10
R. Q.	1936	228	P. +	POSITIVO	10
M. M.	1936	30	P. +	POSITIVO	10
O. J.	1936	212	P. ++	POSITIVO	10
S. de A. M.	1936	368	P. ++++	POSITIVO	10
C. A.	1936	436	P. ++++	POSITIVO	10

Fecha de exhumación: Marzo de 1942.

En estos restos los resultados microscópicos y culturales arrojan una positividad del 100%.

La morfología, caracteres tintoriales y culturales de las cepas obtenidas, tanto en los restos de enfermos como en los de presuntos sanos de lepra, nos permiten considerarlas como de la familia de las *Mycobacteriáceas*, Género *Mycobacterium*.

Los cultivos practicados en huesos de leprosos se hicieron pocos días después de exhumados, en cambio, los de presuntos sanos de lepra se hicieron intencionalmente siete meses después de exhumados, tiempo que permanecieron entre talegos de papel en nuestro laboratorio. Con anterioridad a estas últimas siembras, se habían practicado algunas de huesos de presuntos sanos de lepra, recientemente exhumados, huesos que por carecer de datos sobre fechas de inhumación, etc., no han sido incluidos en esta informa-

ción y que también dieron resultados positivos en los cultivos. Por último queremos llamar la atención sobre la posibilidad de aislar los bacilos de los restos después de 11 meses de exhumados, como al efecto lo hemos comprobado con los huesos traídos de Agua de Dios números 1, 3, y 7, los que habían permanecido en una caja de latón a la temperatura ambiente de Bogotá.

Como controles del suelo se hicieron varios cultivos de muestras de tierras tomadas recientemente en los tres leprocomios, con resultados negativos para bacilos ácidos-alcohol-resistentes en los cultivos, puesto que ya habíamos informado en otro escrito que en las muestras del polvo de los aposentos de enfermos de lepra se encuentran bacilos ácido-alcohol-acetona-resistentes en el examen directo. Posteriormente se repitieron estos cultivos con muestras de las mismas tierras, pero que se habían envejecido dentro de cajas de latón a la temperatura ambiente de nuestro laboratorio y nos llamó mucho la atención el que en estas circunstancias algunos cultivos dieran resultados positivos para bacilos ácido-alcohol-acetona resistentes. Asimismo, queremos hacer notar que cuando los intentos de cultivo se hacen en muestras recientemente tomadas, el tratamiento por el ácido sulfúrico al 10% es insuficiente y en los tubos se cultivan infinidad de gérmenes, en tanto que los cultivos de muestras envejecidas dan cultivos casi en estado de absoluta pureza. Si embargo, las cepas obtenidas no son culturalmente iguales a las obtenidas de restos cadavéricos.

El carácter meramente informativo de estas notas, no nos permite incluir los caracteres culturales de las cepas obtenidas; estas observaciones forman parte de un trabajo en el que reuniremos todas las características de los gérmenes aislados por nosotros del agua, deyecciones de animales de temperatura constante y variable, escamas de las patas de las gallinas, etc., etc., haciendo como es natural la debida diferenciación con los *M. phlei*, *stercusis*, *graminis*, *aluvialum*, etc.

De lo expuesto se puede deducir lo siguiente: en el 100% de los restos cadavéricos se pueden poner de manifiesto bacilos ácido-alcohol-resistentes; gérmenes que son fácilmente cultivables en un 91,66%. No existen datos suficientes para presumir la relación que algunos de estos gérmenes puedan tener con el bacilo de la lepra, cuando los restos son de leprosos; por el contrario, las observaciones que hemos hecho hacen suponer que solamente se trata de bacilos saprofitos.