

METODO PARA CONSTATAR EL ESTADO DE VIDA O MUERTE DE LAS LARVAS DE TRIQUINAS (*TRICHINELLA SPIRALIS*, OWEN) ENQUISTADAS, EN LAS CARNES CONSERVADAS

(Publicado en la Revista del Ministerio de Industrias. Año VII, N.º 47, Julio de 1919)

A fines del año 1918, tocó al Instituto de Anatomía Patológica y Parasitología de la Escuela de Veterinaria, realizar algunas investigaciones con motivo de la comprobación de productos triquinosos expendidos por una fábrica de embutidos. Demostrada la presencia de triquinas en varios de esos productos, que ya habían sido utilizados para la alimentación (1), era de gran importancia establecer si las larvas enquistadas estaban vivas o muertas. El Director del Instituto doctor Kurt Wolffhügel, me encomendó la tarea de hacer esa investigación; y con ese fin, esforzándome por llegar a un diagnóstico exacto, hice una serie de experiencias que me permitieron obtener datos de gran valor y condiciones precisas, como norma de juicio. Resultados de esas experiencias son los que paso a exponer brevemente, como contribución a la solución de un problema que tanta importancia tiene, desde los puntos de vista higiénico y médico.

La bibliografía es completamente pobre en este asunto; no hay establecida ninguna norma precisa para un diagnóstico de esa naturaleza: salvo lo que dice Ransom (2), en un trabajo sobre los efectos de la refrigeración sobre las larvas de *Trichinella spiralis*.

Rennes (3), al hablar de la investigación y examen de los parásitos, después de tratar sobre la comprobación de la triquina, dice que la vitalidad de los parásitos de una manera general, se establece por la acción del calor o haciendo actuar una solución de picrocarmín; con este reactivo, si los parásitos estuvieran muertos se colorarían; lo contrario, si estuvieran vivos.

Los procedimientos indicados por Rennes (1. c.), fueron los primeros de que hice uso, utilizando para ello, además del material

(1) Varias personas habían comido de esos productos (jamones), cuando se comprobó que estaban triquinosos.

(2) B. H. Ransom. — Effects of refrigeration upon larve of *Trichinella spiralis*. — *Journal of Agricultural Research*. January 31 1916, Washington.

(3) J. Rennes. — *Traité de l'inspection des viandes de boucheris*. — 1910, Masson & Cia. — Paris.

motivo de los ensayos, preparaciones de músculos de ratas triquinosas, recientemente muertas con ese fin; los resultados demostraron la insuficiencia de los procedimientos. Por la calefacción suave de las preparaciones no se obtuvo movimiento visible de las larvas, tanto en las preparaciones de jamón triquinoso como en las de músculos de ratas; sin embargo, las larvas de estos últimos estaban vivas, como debía suponerse y así resultó de los ensayos realizados.

En cuanto a la acción del picro-carmin, los resultados fueron del mismo orden. Pequeñas fracciones de carne con triquinas de ambos orígenes, fueron colocadas previa dislaceración, en una solución de picro-carmin; las fibras musculares tomaron los colores, dificultando la visibilidad de las larvas, pero éstas nunca se coloraron y sin embargo, según resultó de investigaciones posteriores, las de las preparaciones de jamón estaban muertas.

En vista de tales resultados me decidí a hacer algunas experiencias, propendiendo a establecer condiciones más precisas como base de un diagnóstico exacto.

Fué mi primera orientación obtener la liberación de las larvas enquistadas, para hacerlas más accesibles a la observación y a la acción de los excitantes físicos y químicos. Para ello ensayé la digestión artificial de los músculos triquinosos por el jugo gástrico.

Para la digestión utilicé, primeramente, jugo gástrico preparado según la fórmula que da Ransom en su trabajo citado, que es la siguiente:

Pepsina gramos 2.50
Acido clorhídrico c. c. 10.00
Cloruro de sodio gramos 5.00
Agua hasta formar c. c. 1000

En la digestión del jamón triquinoso prescindí del cloruro de sodio, en la preparación del jugo gástrico, por encontrarse ya esa substancia abundantemente en el jamón.

Primera experiencia

Tres a cinco gramos de jamón bien desmenuzado, eran colocados en 150 a 200 c. c. de jugo gástrico (según la fórmula indicada) en un matraz Erlenmeyer y luego puesto en estufa a 37°-38° c. por espacio de 18 a 20 horas. Al cabo de ese tiempo, aunque el aspecto era de que la digestión no estaba terminada, hice el examen microscópico, echando una parte del contenido del matraz, previamente bien agitado, en una cápsula de Petri. Para ese examen utilicé el mismo aumento que para el examen triquinoscópico común (obj. 16 m. m. y ocular 2).

Observé varias larvas libres, todas afectando la forma de cifra 6 (fig. 1) y algunos quistes en vía de digestión.

Coloqué nuevamente el matraz en la estufa para que continuara la digestión; al cabo de otras 24 horas hice nuevamente el examen: todos los quistes estaban disueltos y las larvas libres, afectando todas ellas la forma de cifra 6. Las larvas no reaccionaban por calefacción, que al principio la hice suavemente y luego más fuerte.

El aspecto uniforme de todas las larvas (en cifra 6) y la no reacción al calor, hacía suponer que estuvieran muertas.

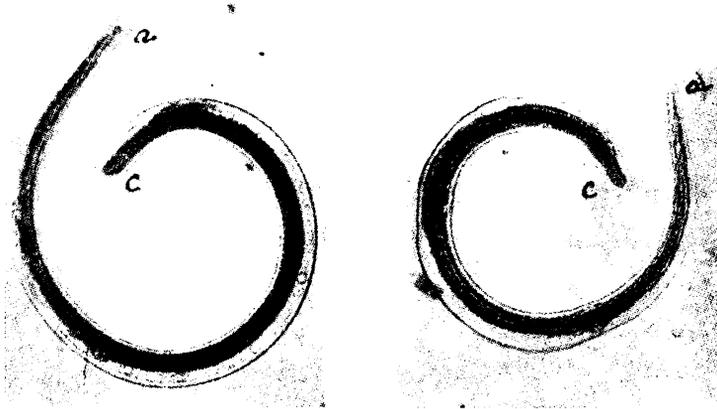


Fig. N.º 1. — Larvas muertas de *Triquinella Spiralis*. Muestran la forma en cifra 6

Segunda experiencia

Deseando aclarar bien los hechos y dar justa interpretación a las observaciones anteriores, puse en digestión artificial en las mismas condiciones que la experiencia primera, músculos de ratas triquinosas, recientemente muertas a ese fin, y comprobada la existencia de larvas de triquina con la observación microscópica. Observé entonces, que todas las larvas libres afectaban la forma de una espiral completamente cerrada y que por calefacción suave se movían, desenvolviéndose (Fig. 2).

Tercera experiencia

Pensando en el posible error de que las triquinas del jamón, aún estando vivas, pero con vitalidad muy disminuída por la salazón y tiempo de conservación, podían resultar muertas al final de la

digestión artificial, por la acción del ácido clorhídrico en fuerte concentración ($10 \text{ }^0/_{00}$) del jugo gástrico, y teniendo en cuenta que el jugo gástrico natural actúa enérgicamente a una concentración ácida sólo del $2 \text{ }^0/_{00}$ y que la fuerte proporción indicada por Ransom debe obedecer a evitar por ese medio la putrefacción, factor que en este caso muy poca importancia tiene por la brevedad de la experiencia (1), hice un nuevo ensayo de digestión artificial con jugo gástrico de acidez $5 \text{ }^0/_{00}$ solamente, y aumenté la cantidad de pepsina para hacer más activa la digestión. El jugo gástrico empleado quedó formado según la siguiente fórmula:

Pepsina	gramos 5.00
Acido clorhídrico.	c. c. 5.00
Agua destilada hasta.	c. c. 1000

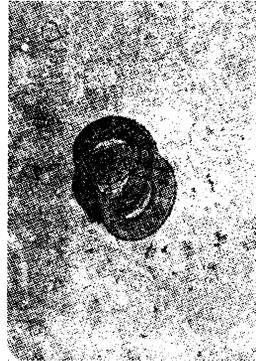


Fig. N.º 2. — Larvas vivas del mismo parásito, en espiral un tanto desenvuelta por la acción del calor

Cuando en lugar de digerir jamón digería músculos de rata, agregaba cinco gramos de cloruro de sodio. Puesto a digerir en las mismas condiciones de temperatura, resultaban al cabo de las 18-20 horas, libres todas las larvas y comprobé que aún en esas condiciones las larvas afectaban la misma forma.

(1) El día 4 del mes de Abril próximo pasado, a pedido del señor doctor Kurt Wolffhügel, puse a digerir en jugo gástrico con ácido clorhídrico en concentración del $5 \text{ }^0/_{00}$ una rata triquinosa entera (menos la piel), para numerar las larvas que tenía en el sistema muscular. El líquido de digestión entró en putrefacción a las 48 horas, posiblemente porque el ácido clorhídrico fué neutralizado por la cal de los huesos, pues al final de ese tiempo (48 horas) tenía reacción alcalina; sin embargo las larvas estaban aún vivas el 2 de Mayo, lo que prueba que resisten mucho a la putrefacción.

ACCION DE LOS COLORANTES

En el deseo de comprobar si el uso de algunos colorantes podrían ser utilizados como elementos de prueba para establecer el estado de vida o muerte de las larvas de triquina, hice algunas experiencias.

Comencé por utilizar el Picro-carmín recomendado por Rennes (l. c.).

Primera experiencia

Puse a digerir, en las condiciones indicadas anteriormente, por una parte pequeñas porciones del jamón triquinoso, y por otra de músculos de rata triquinosa, en matraces de Erlenmeyer. En cada matraz, que contenía aproximadamente 50 c. c. agregué 8 a 10 c. de Picro-carmín; colocados en la estufa a 37°-38° c. los retiré a las 18-20 horas; hecho el examen microscópico, observé que las triquinas procedentes del jamón, además de afectar la forma de cifra 6, el protoplasma estaba colorado intensamente en amarillo (razón por la cual aparece en negro en la Fig. 1); las triquinas procedentes de los músculos de rata estaban en espiral cerrada y completamente incoloras.

Constituía un dato más en favor del estado de muertas de las triquinas procedentes del jamón. Sin embargo, me llamó la atención que el protoplasma apareciera solamente colorado en amarillo, dando la impresión de que sólo hubiera actuado el ácido pícrico y no el carmín. Para aclarar ese punto, hice la siguiente experiencia:

Segunda experiencia

Coloqué a digerir en dos Erlenmeyer, por separado, jamón, más jugo gástrico, más carmín, y jamón, más jugo gástrico, más ácido pícrico. Al final del tiempo de digestión (18 a 20 horas), comprobé que las triquinas que sufrieron la acción del carmín permanecían completamente incoloras, mientras que las que habían estado en contacto con el ácido pícrico se habían colorado intensamente en amarillo. Quedaba, pues, perfectamente aclarado que la coloración que tomaban las triquinas muertas por la acción del Picro-carmín, se debía exclusivamente a la acción del ácido pícrico, con prescindencia del carmín.

Tercera experiencia

Pensé que la diferencia de acción de los dos colorantes podría tener como causa, que la cutícula quitinosa de la triquina ofrecía resistencia (a pesar de su estado de muerta) al pasaje de las sustancias de moléculas complejas, poco difusibles y bastante próximas sus soluciones a las soluciones coloidales, como el carmín y gran

número de las sustancias colorantes. A este respecto hice algunas experiencias, colocando larvas muertas de triquinas en presencia de soluciones de carmín, eosina, rojo neutro, ácido pícrico, ácido crómico, y obtuve el siguiente resultado: las larvas colocadas en soluciones de ácido pícrico y ácido crómico (sustancias perfectamente cristaloides y solubles) se coloraron en pocas horas (4 a 10 horas); las colocadas en Eosina y Rojo neutro (sustancias de moléculas complejas y de solubilidad incompleta en el agua), presentaron un principio de coloración a los 5 o 6 días; las colocadas en Carmín no se habían colorado aún en ese plazo. Hay que agregar, que no es difícil que la coloración observada en las larvas colocadas en las soluciones de Eosina y Rojo neutro, se deba aún en parte a la alteración sufrida por la cutícula de las larvas, debido al tono molecular bajo del líquido en que estaban sumergidas, haciéndolas quizás más permeables.

Experiencias complementarias

Para obtener mayor seguridad, si realmente la forma en cifra 6 de las larvas de triquinas y la coloración por el ácido pícrico, constituían suficiente garantía del estado de muertas, hice los siguientes ensayos y observaciones:

1.º Un matraz conteniendo larvas vivas de triquinas procedentes de la digestión de músculos de rata, fué calentado, suavemente al principio e intensamente después; observadas luego al microscopio, comprobé que las larvas habían afectado la forma de cifra 6 y se coloraban por el ácido pícrico.

2.º Un matraz conteniendo larvas vivas de triquinas, del mismo origen que el anterior, en el jugo gástrico que había servido para digerirlas, sirvió para ensayos periódicos, habiendo comprobado que después de una permanencia de 30 a 40 días en esas condiciones, la forma de espiral cerrada que afectaban en plena vitalidad, se iba haciendo más abierta y las larvas reaccionando menos a la acción del calor, y al cabo de un tiempo todas ellas habían perdido la sensibilidad al calor y presentaban la forma en cifra 6.

Si a estas observaciones agregamos lo que dice Ransom en su trabajo citado, de que las larvas muertas por el frío afectan también la forma en cifra 6, nos vemos inclinados a suponer que esa forma sea característica de las larvas de triquinas muertas, (salvo el caso posible de una muerte rápida, con coagulación instantánea del protoplasma o alteración de la cutícula) y ello se explicaría por la forma especial de la cutícula adquirida en su desarrollo espiral dentro de la cápsula quística.

Debo consignar que esa forma que damos como característica, sólo se observará quizá cuando las larvas están colocadas en un me-

dio líquido de tono molecular bajo o hipotónico, con pequeñas cantidades de sales en disolución, como las utilizadas en mis experiencias; si se emplearan soluciones salinas o moleculares de otro orden, concentradas, (hipertónicas), el parásito perdería líquido y la cápsula aparecería flácida y sin forma propia; por eso es conveniente no agregar cloruro de sodio al jugo gástrico cuando se va a digerir carnes preparadas a base de sal (1).

En lo que respecta a la observación del jamón triquinoso empleado en estas experiencias, debo consignar que el estado de muertas, de las larvas, quedó comprobado también por experiencias de ingestión, hechas en el Instituto de Anatomía Patológica por el doctor Kurt Wolffhügel. A varias ratas blancas se les hizo comer fracciones triquinosas del jamón; unas fueron muertas en horas sucesivas de la ingestión y no se comprobó en ningún caso larvas vivas en el contenido gastro-intestinal; otras quedaron para observar si se producía invasión larval en el sistema muscular, obteniendo también resultado negativo; hizo igualmente, una experiencia administrando jamón a un gato, con el mismo resultado negativo.

CONCLUSIONES

De las experiencias relatadas resulta:

1.º Que la digestión artificial permite poner en libertad las larvas enquistadas de *Trichinella spiralis*, sin perjudicarlas sensiblemente, en el término de 18 a 20 horas, necesario para que la digestión tenga lugar (2).

2.º Que las larvas muertas, una vez en libertad, adoptan la forma en cifra 6, característica (con la salvedad hecha en otro lugar, de que eso no es probable en una muerte con coagulación instantánea del protoplasma o alteración profunda del saco cuticular); las larvas vivas afectan una forma de espiral y reaccionan fácilmente al calor.

3.º Que el ácido pícrico colora fácilmente el cuerpo protoplasmático de las larvas muertas y deja incoloro el de las larvas vivas, y que los colorantes de constitución molecular compleja, como los colores derivados de la anilina, y el carmín y otros, no coloran o coloran difícilmente el cuerpo protoplasmático de ese parásito, su puesta se entiende, la integridad de la membrana cuticular.

(1) Hice la siguiente experiencia: En una caja Petri conteniendo triquinas muertas, agregué glicerina hasta una concentración al 1/3. Al cabo de 1 a 2 horas, las larvas habían perdido la forma que damos como característica.

(2) Confirma las observaciones de Ransom y anteriores de otros autores.

De acuerdo con nuestras experiencias, aconsejamos el siguiente método, para establecer el estado de vida o muerte de las larvas de triquinas enquistadas.

Se prepara jugo gástrico artificial, según la fórmula:

Pepsina grs.	5
Acido clorhídrico concentrado c. c.	5
Cloruro de sodio grs.	5
Agua hasta formar c. c.	1000

Se puede también preparar jugo gástrico artificial, a partir de la mucosa de estómago de perro o gato, en la siguiente forma:

Mucosa fresca de estómago de perro o gato grs.	50
Ac. clorhídrico concentrado c. c.	5
Agua hasta c. c.	500

Se pone en maceración en la estufa 38°-40°, por 12-24 horas y luego se filtra por algodón; al usarlo se diluye en el doble de agua y resulta una solución muy activa. Esta fórmula la usé en mis experiencias con resultados superiores a la anterior.

Se toma luego el material triquinoso, se divide en pequeñas porciones, como las que se utilizan para el examen triquinoscópico por el compresor, y en un matraz o vaso de vidrio se agrega jugo gástrico a razón de 10-15 c. c. por cada gramo de materia muscular, y se coloca en estufa a 38°-40°; se puede emplear temperatura más baja, pero la digestión se hace entonces más lentamente; en cambio, no conviene pasar de 40° porque se debilita la pepsina y además se puede perjudicar la vida de las triquinas, lo que tendría gran importancia, dado el caso que tuvieran poca vitalidad. A las 18 o 20 horas de permanencia en la estufa, se retira el vaso o matraz; puede dar la impresión de que la digestión no ha sido completa, observándose aún tejido muscular, pero en el examen microscópico se encontrarán las larvas ya libres, pues el tejido conjuntivo interfibrilar y el quístico se digieren con suma facilidad; si esto no sucediera se deberá a que el jugo gástrico empleado tiene muy poco poder digestivo y convendrá entonces, dejar 12 o 24 horas más en la estufa o renovar el jugo gástrico.

Para el examen microscópico se agita bien el contenido del matraz e inmediatamente (no dando lugar al depósito de las larvas) se echa una parte en una caja de Petri y se procede al examen utilizando el aumento de examen triquinoscópico corriente (objetivo 16

milímetros, ocular 2). — Si las triquinas estuvieran vivas, se les verá en espiral más o menos cerrada y por la calefacción suave se observarán movimientos. La Fig. 2 muestra las triquinas vivas excitadas por la calefacción. Si estuvieran muertas se observarán en forma de cifra 6 y no reaccionarán por el calor; si se le agrega ácido pícrico, el cuerpo protoplasmático se colorará en amarillo intenso al cabo de 4 a 5 horas (Fig. 1).

Para mayor seguridad y abreviar el diagnóstico, se pueden preparar dos digestiones simultáneas: una según queda indicada y otra con el agregado de 3 c. c. de solución concentrada de ácido pícrico por cada 100 c.c. de jugo gástrico utilizado. Al hacer esto se observará la formación de un precipitado (albuminoideos precipitados por el ácido pícrico); el jugo gástrico pierde sin duda alguna, por esa circunstancia, una parte de su poder digestivo, (los precipitados albuminoideos producidos en las soluciones de diastasas arrastran consigo parte de éstas), pero, si ha sido preparado con pepsina activa o con mucosa estomacal, (en las condiciones que hemos indicado), la digestión tendrá lugar suficientemente para poner en libertad las larvas de triquinas, según lo he comprobado en todas mis experiencias.

Puestos en la estufa los dos matraces, se retiran al cabo de las 18 a 20 horas y se procede al examen microscópico. — Del que no contiene ácido pícrico se hará según queda descripto; del que contiene ácido pícrico se vierte parte del contenido, previamente bien agitado, en una cápsula de Petri y se le agrega, por gotas, solución de soda o potasa hasta que desaparezca el precipitado que se había formado por la adición del ácido pícrico; se procede entonces al examen microscópico. Las larvas vivas aparecerán en espiral más o menos cerradas, traslúcidas, incoloras; las larvas muertas en forma de cifra 6, con el cuerpo protoplasmático en amarillo intenso y retraído, muy separado de la cubierta cuticular, salvo en dos o tres partes (Fig. 1), que en forma de abultamientos quedan próximos a la cutícula; la separación del cuerpo protoplasmático de la cutícula, se debe probablemente al ingreso de líquido a través de la misma y que hace turgesciente al parásito; los abultamientos corresponden a partes que conservan adherencias con la cutícula, o a órganos de contextura rígida, no cediendo así a la presión del líquido.

El cuerpo de las larvas en forma de cifra 6 no ocupa un mismo plano; si imaginamos una de esas larvas con la extremidad afilada, (bucal) hacia arriba, observándola por la parte convexa (del brazo largo) notaremos que el brazo corto está desviado hacia la derecha, colocado sobre un plano que incide en ángulo agudo al plano del brazo largo, correspondiendo al punto de mayor abertura a la extremidad gruesa (caudal) (c.). Este hecho y demás apuntados, ponen de relieve que la forma en cifra 6 descripta, es una espiral muy

abierta, forma normal de la cutícula, adquirida por el desarrollo espiraliforme dentro del quiste conjuntivo —que la toma cuando han desaparecido—, por la muerte o inhibición, la contractibilidad.

Ransom, en el trabajo citado, describió algunas alteraciones de la parte protoplasmática de las triquinas muertas por la acción del frío: color más pálido del cuerpo celular, aspecto granuloso especial del protoplasma, núcleos muchas veces no aparentes; el aspecto granular de las células sería difícil de describir. Yo no he acordado mayor importancia a estas alteraciones, porque en su mayor parte constituyen diferencias de grado difíciles de apreciar y que están por otra parte ligadas a los factores que provocaron la muerte de las triquinas; no es difícil que algunas de esas alteraciones correspondan a fenómenos de plasmolisis ocasionados por la muerte por el frío.

He deseado, con el presente trabajo, dejar establecido un procedimiento con condiciones bien precisas para comprobar en un breve plazo (18-20 horas) el estado de vida o muerte de las larvas de *Trichinella spiralis* (Owen), cuestión que tiene mucha importancia, sobre todo, para casos análogos como el que motivó mis experiencias, en que varias personas habían comido jamón triquinoso, y que para instituir un tratamiento en ellas se hubiera tenido que esperar los resultados de experiencias largas como son las pruebas de ingestión en animales de laboratorio.