

INVESTIGACIONES SOBRE LA ACCIÓN TERAPÉUTICA DE LOS COLORANTES Y DEL VIOLETA DE GENCIANA EN PARTICULAR⁽¹⁾

por el doctor

M. ARMANGUÉ FELIU

de Barcelona.

Desde largo tiempo vienen empleándose en las técnicas bacteriológicas los colorantes anilínicos en especial las anilinas básicas que, por decir verdad, se hallan constantemente entre las manos del técnico. No sólo su uso es debido a sus propiedades, sino a un sin fin de otras útiles e interesantes particularidades. Así es que han ido los colorantes ensanchando su campo de utilidad desde los albores de la ciencia bacteriológica hasta la fecha, en que su reciente entrada en el campo de la terapéutica ha marcado un interesante y nuevo rumbo a seguir en la lucha antimicrobiana.

Uno de los usos primeros a que se destinaron algunos de los colorantes fueron sus cualidades inhibidoras selectivas ante determinadas especies microbianas, siendo la aplicación más conocida el viejo proceder del verde de malaquita para el aislamiento del bacilo de EBERTH a partir de las heces, en cuyo producto por predominar el bacilo COLI queda el germen tífico en estado de inferioridad germinativa, dificultando su aislamiento para cuya consecución se han divulgado una serie de técnicas, entre la que cuenta la del verde de malaquita, que posee la propiedad de impedir el desarrollo del B. COLI, permitiendo el del B. EBERTH, siempre que se le utilice a una concentración apropiada (1/3000 a 1/4000).

El azul de metileno, de poder antiséptico nulo frente a muchos gérmenes encuentra, a pesar de ello, algunas aplicaciones inhibidoras.

La safranina se emplea mucho también por sus propiedades que le asemejan extraordinariamente al violeta de genciana.

El rojo neutro actúa rarísimamente como inhibidor, pues ante la mayoría de gérmenes está en absoluto desprovisto de acción, como lo indica su tan frecuente uso en el estudio de las propiedades reductoras de los organismos, para cuyo tecnicismo es la substancia de elección.

Finalmente se demostró la acción inhibidora selectiva del violeta de genciana. Dicho colorante, uno de los más empleados y que usualmente se toma para efectuar la coloración por el proceder diferencial de GRAM, se manifestó inhibidor en general para todos los microorganismos, pero actuando muchísimo más intensamente ante los gérmenes GRAM positivos. Pronto se aprovechó esta particularidad que facilita sobremanera el aislamiento de algunas especies GRAM negativas en productos pululados al mismo tiempo

por gérmenes GRAM positivos; se han aconsejado en consecuencia numerosos medios de cultivo adicionales de cantidades bien determinadas del colorante, siendo el medio más útil y conocido entre ellos el de PETROFF, utilizado para el aislamiento y cultivo puro, a partir de productos muy infectados, como los esputos, del bacilo de KOCK, ante el cual el violeta de genciana no demuestra acción apreciable alguna.

Lo demostrado para este colorante no tardó en extenderse a otros productos similares: así se comprobó la acción inhibidora-selectiva del kristall-violet, safranina, verde brillante, etc., etc.

Las cosas en este punto, fácil es de comprender que viniera la idea de intentar su utilización en la terapéutica humana para colmar un vacío que la vacunación, la seroterapia, etc., no colmaban. Se presintió la utilidad de los colorantes ante muchas septicemias, especialmente las causadas por gérmenes GRAM positivos, precisamente las más graves entre todas; se pensó en su posible aplicación incluso en infecciones externas, quirúrgicas, en determinadas infecciones localizadas de difícil acceso y se decidió, en fin, a intentarlo en todo tipo de infección para determinar su campo de utilidad.

YOUNG y HILL junto con SMITH y CASPARIS, fueron los primeros que (fundándose en los trabajos de CHURCHMANN sobre la inhibición de los GRAM positivos por el violeta de genciana), emplearon dicho colorante en el hombre, luego de haber comprobado el grado de toxicidad en los animales. A estos autores siguieron pronto muchos otros ingleses y americanos que estudiaron exclusivamente el colorante que nos ocupa, aplicándolo al comienzo sólo en septicemias streptocócicas y stafilocócicas, tomando especial interés los casos con localización en el endocardio. Efectivamente, de grandísimo interés resultaba el nuevo método de tratamiento, permitiendo, mediante la administración endovenosa del producto, una verdadera desinfección química, un ataque de los gérmenes en su propia guarida y una acción instantánea.

Los primeros resultados fueron francamente buenos en manos de los que ensayaron el procedimiento. El violeta de genciana resultaba inocuo en los animales a dosis aún superiores a la de 10 miligramos por kilogramo de peso; en el hombre se comprobó la inocuidad de dosis más pequeñas para pasar a dosis mayores, hasta llegar bastante por encima de los 10 miligramos por kilo, a cuyas alturas algunas personas aparecían con las mucosas coloreadas en violeta

(1) Trabajo premiado en el concurso ARS MEDICA.

pero sin presentar síntoma alguno de intoxicación; sin embargo, este incidente fué suficiente para que no se prosiguiera el aumento de dosis. El colorante era empleado por todos en solución acuosa, sin alcohol, más o menos diluído, pero oscilando generalmente entre el 1 por 100 y el 1 por 500. Unos experimentadores esterilizaban la solución y otros no, fundándose en su propio poder esterilizante que a tan fuerte concentración abarca todos los gérmenes habituales.

La administración era siempre endovenosa, que precisa efectuar con sumo cuidado, ya que las soluciones fuertes de violeta de genciana son extremadamente dolorosas en el tejido subcutáneo, llegando a producir lesiones como ulceraciones y escaras sumamente molestas y que recuerdan las producidas por el salvarsán cuando escapa de la vena.

Finalmente, las dosis humanas quedaron fijadas en 5 miligramos de colorante por kilogramo de peso del enfermo, según unos, y en 7, según otros.

Las septicemias streptocócicas y las stafilocócicas fueron vencidas en varios casos con tan sólo una inyección que actuó admirablemente como inyección esterilizante y bastaron en muchos otros casos tres o cuatro inyecciones para obtener idéntico resultado.

En todos los casos se obtenía la negativación del hemocultivo desde la primera inyección. Esta era seguida de un reposo de 48 horas, pasadas las cuales repetían la inyección para continuar el tratamiento en esta forma más por prudencia o para acabar con las leves manifestaciones que quedarán que por una verdadera necesidad. Sin embargo, pueden efectuarse las inyecciones diariamente, pero hay que tener en cuenta que deben en este caso vigilarse las dosis mediante el examen de la sangre del enfermo, ya que las dosis altas o demasiado próximas producen una leucopenia que se ha considerado como no conveniente aunque no hayan pruebas concretas que permitan esta afirmación.

Nuestros estudios sobre este particular nos inducen a no dar excesiva importancia a esta leucopenia que hemos encontrado ser pasajera, ya que antes de las doce horas, la cifra leucocitaria ha remontado a la inicial.

Hay que tener presente también que, en general, el tratamiento por el violeta da resultados precoces y es inútil insistir en los casos que no manifiesten mejoría alguna desde las primeras inyecciones si éstas han sido dadas con dosis suficientes.

Pasado este período, que podemos llamar clásico, de estudio del violeta de genciana en las stafilococias y streptococias, se multiplicaron los experimentadores y los colorantes utilizados.

Muchos experimentaron bien, otros mal, unos daban dosis suficientes y otros las daban pequeñas en exceso. En fin, los primeros resultados que en los informes de autores de crédito, pulcros y meticulosos, eran excelentes, fueron plenamente confirmados por unos, medianamente por otros, y aún desmentidos por algunos. Sin embargo, débese andar con sumo cuidado al aceptar un juicio ajeno, tanto más si no

se conocen exactamente las condiciones en que se ha operado; así, pues, no podemos tener en cuenta ninguno de los resultados que han administrado dosis de 2 miligramos por kilo, pues si los aceptáramos nos expondríamos a tener que aprobar algún día algún trabajo de original autor en el que sostuviera la ineficacia del pan como alimento..., tomado a estas dosis.

El nuevo curso de los estudios fué como hemos dicho, la revisión de muy distintos colorantes más o menos conocidos y utilizados, empleándolos en multitud de infecciones.

Así vemos en un hermoso trabajo de ELLINGWORTH (Ghem. Age. London, 27 Oct. 1923) que el tripanosoma puede ser destruído por el verde de malaquita a las 48 horas de su inyección en la sangre, que la safranina y algunas auráninas son muy útiles en algunos casos de malaria, que las oxazinas son muy activas ante los paramecios.

BURKE y RODIER (1925), obtuvieron buenos resultados con el empleo del violeta de genciana o acriflavina en la septicemia carbuncosa de los carneros, septicemia fatal sin este recurso.

Los antedichos trabajos dan una idea de la variedad de infecciones sometidas a la terapéutica por colorantes, y muchos más podríamos citar si no temiéramos alargar en exceso la parte de historia del presente escrito.

Pronto una observación importante dió nuevas orientaciones a los investigadores interesados en estos problemas. Efectuando estudios para la determinación de la dilución máxima en que los colorantes manifiestan aún propiedades anti-microbianas, no tardó en observarse que las concentraciones de colorante debían ser mucho más fuertes en presencia de materias albuminosas (suero, sangre, etc.) que cuando estas albúminas eran ausentes del medio de cultivo o líquido ambiente. Efectivamente, la propiedad que poseen las albúminas todas, de fijar más o menos intensamente los colorantes empleados en estos estudios daban la explicación de lo ocurrido: el colorante unido a la albúmina en forma más o menos estable era incapaz de actuar sobre las bacterias. Estas, pues, *in vitro* para ser perjudicadas por los colorantes en medio albuminoso exigen la presencia de colorante en exceso, por lo que la concentración del producto debe ser mayor.

Este hecho unido a ciertos inconvenientes del violeta de genciana como es, por ejemplo, el gran poder tintorial que le hace de un empleo engorroso hizo que este colorante, que era el corrientemente utilizado, fuera pospuesto a productos nuevos que la química descubría con rapidez sorprendente. La mayoría de productos eran derivados de la acridina y algunos de las auráninas. Las ventajas que se concedían a los nuevos productos eran de no ser tan intensamente colorantes como los primitivos, de actuar igualmente en presencia como en ausencia de suero, de ser activísimos y de actuar intensamente sobre ciertos gérmenes GRAM negativos (p. e. gonococo, meningococo, etc.), aunque menos poderosamente que sobre los GRAM positivos, llegando algunos colorantes, al decir de

sus autores, a tener acción aprovechable sobre los más resistentes GRAM negativos (p. e. el COLI).

Así fué como hombres de ciencia y casas comerciales recomendaron cada uno por su lado la proflavina (sulfato de diamino-acridina), la acriflavina (clorometilato de diamino-acridina), el rivanol (clorhidrato de 2—etexi—6. 9 diamino-acridina), la tripaflavina (clorhidrato de diamino-metil-acridina), y el mercurio-cromo-220, para no citar más que los más conocidos.

Luego se pasó al estudio de las sustancias fotosensibilizadoras, como el yoduro de dimetilcarbocina y el trimetil-isociamina, que alcanzan como los derivados del grupo de las quinoleínas a poseer una dilución máxima de actividad superior al 1 por un millón.

Sin embargo, con todos estos cuerpos ha ocurrido lo mismo que con las auraninas: su precio elevadísimo ha imposibilitado su uso en la práctica, tanto más cuanto productos económicos se manifiestan casi o tan activos como aquéllos. Quizás de estas sustancias las únicas que se emplean en algunos países son las auraninas, cuyo uso en cirugía para la cura de heridas bajo la forma de pomadas es de cierta utilidad.

Una vez los estudios en este punto, ha sobrevenido una cierta relajación en la intensidad expectativa que la nueva terapia había despertado; al mismo tiempo se ha abandonado la pauta puramente científica que hasta entonces había regido su uso y tal como ocurre constantemente en las aplicaciones prácticas de las nuevas conquistas terapéuticas, la aplicación de los productos que nos ocupan ha virado en cierto modo hacia el empirismo, ya que se administran a veces en procesos en que tanto la teoría como la práctica han demostrado ser resistentes en absoluto a estas armas. Añádase a esto el desconocimiento de las dosis activas, la insuficiencia general de las administradas y véase si no es cierta nuestra afirmación.

Y sin embargo, a pesar de todas las desviaciones y desorientaciones, el método terapéutico a base de colorantes es de una grandísima utilidad, de un concurso insustituible en muchos procesos que para realzar lo que afirmamos, son precisamente de los más graves y de los más desamparados por los recursos anti-infectivos hasta ahora conocidos.

Este convencimiento que tenemos profundamente arraigado, ya que lo hemos adquirido en el laboratorio y al pie del enfermo, es el que nos lleva a la exposición de nuestros trabajos.

* * *

El estudio de los colorantes que hemos efectuado en el laboratorio, nos ha permitido clasificar ya prontamente las distintas anilinas y demás productos comprobados.

La mayoría de los colorantes empleados han manifestados su acción, pero desde luego, los hay mucho más activos que otros.

Recuérdese lo que hemos escrito anteriormente respecto a productos que, como el rojo neutro, son de un poder tan ínfimo, que se pueden emplear incluso a dosis altas como indicadores o base de procesos investigados en bacteriología.

La acción inhibitoria que poseen estos colorantes a dosis masivas no puede aceptarse obedezca a idéntico mecanismo que la manifestada por los colorantes de intenso poder antiséptico, sino que debe asimilarse más a la acción de la glucosa o de la glicerina, los cuales a dosis determinadas no sólo no impiden sino que favorecen grandemente el cultivo de los microorganismos, pero que en concentraciones fuertes son inhibitorias o aún antisépticas (glicerina).

Entre los colorantes cuyo poder anti-microbiano tenía interés (por muy interesantes aplicaciones que sus afinidades hacían preveer) se cuenta la eosina (colorante ácido). Nuestras experiencias sobre la misma han demostrado su inutilidad ya que los medios de cultivo tanto líquidos como sólidos adicionados de eosina a dosis altísimas, a más de 1 por 1000, que los colorean intensamente, no impiden ni tan sólo retardan respecto a los controles el cultivo de las especies todas tanto GRAM positivas como GRAM negativas. Entre los de acción ínfima también aunque no tanto como los anteriores, hemos encontrado el azul de metileno, cosa que ya esperábamos por el uso que de él se hace en algunos medios de cultivo diferenciales; quizá este hecho sorprenda a más de un clínico dadas las múltiples enfermedades infecciosas en que las terapéuticas recomiendan su uso como antiséptico: infecciones urinarias todas, colitis, conjuntivitis, etc. Pues bien, la acción del azul de metileno debe buscarse en otro mecanismo, si es que efectivamente se manifiesta; así, pues, en su acción real en las infecciones urinarias se pueden observar influencias otras que su presunto poder antiséptico, influencias que hacen apreciable su uso, por ejemplo, en ciertas albuminurias de origen no microbiano, tóxicas, idiopáticas, etc. Será bueno decir para convencimiento de los incrédulos, que entre los medios diferenciales a que hemos aludido antes se halla el de González, que se utiliza al igual que el de Endo en el *aislamiento y diferenciación de los bacilos del grupo EBERTH-COLI*, los mismos que causan la generalidad de infecciones *contra las cuales se preconiza el azul de metileno*, substancia esencial entre las contenidas por dicho medio. Aún más peso en el ánimo del lector hará el recordar que el azul de metileno se emplea para la «coloración vital» de muchas bacterias. La única aplicación en que el azul de metileno responde eficazmente y con seguridad debido a ejercer una acción anti-microbiana es en la de los procesos en que interviene el bacilo fusiforme de VINCENT; la acción sobre este germen es difícil de comprobar *in vitro*, dadas las enormes dificultades y los discutibles resultados con que se tropieza en el cultivo del bacilo fusiforme.

Lo mismo que hemos dicho para el azul de metileno, puede aplicarse a la fuchina básica, empleada también en medios diferenciales de cultivo (ENDO).

La thionina, de la que algunas casas comerciales han recomendado algunos derivados, ha sido por otros ensayada junto con éstos sin obtener resultados comparables a la mayoría de los colorantes hiperactivos; estos productos, a los que se ha intentado dar renombre como anti-tíficos, no se muestran más activos que los demás frente al germen de EBERTH, ya conocido como resistente a la terapia colorante.

Entre los colorantes de laboratorio realmente activos, hemos de citar el violeta de genciana, el kristal-violeta, el verde de malaquita y la safranina, de los cuales son selectores, atacando con muchísima más energía a los gérmenes GRAM positivos. Esta selectividad va ligada, a nuestro entender, con la presencia de la substancia lipoproteica de SCHUMACHER, que caracteriza las bacterias GRAM positivas y que según GUTSTEIN se halla condensada en el ectoplasma.

El colorante que se nos ha mostrado más activo en estas experiencias *in vitro*, ha sido el violeta de genciana. Ahora bien, nos hemos encontrado con un hecho muy fácil de evidenciar y de cierta importancia para valuar los trabajos sobre terapia colorante: los productos que nos ocupan son de una variabilidad bastante acentuada en su poder antiséptico, según las marcas empleadas, habiendo incluso anchas diferencias sobre muestras varias de una misma casa. El que hemos hallado menos variable o más constante ha sido el kristal-violeta, producto cristalizado de composición bien definida, a la inversa del violeta de genciana, producto amorfo de composición muy variable.

Este hecho que obliga a tener muy en cuenta la calidad de los productos empleados y a repetir las experiencias con diferentes muestras y marcas de colorante va acompañado de otro factor que subraya las dificultades citadas. Dentro de una misma especie microbiana se encuentran razas de gran sensibilidad ante un colorante determinado, mientras otras razas de la misma especie y del mismo origen pueden resistir bastante o mucho más a la misma muestra de colorante.

He ensayado muy diversas muestras de violeta de genciana, siendo las de más potencia antiséptica la «R. A. L.» y la de GRUBLER. Estas muestras han llegado a impedir el crecimiento del Pneumococo y del Streptoco hasta en dilución de 1 por un millón, tanto en medio líquido (caldo o medio especial de TRUCHE-COTONI, llamado «medio T»), como en medio sólido (los mismos con agar), dilución que no manifestaba la más leve coloración del violeta. No hay que decir que siempre hemos efectuado controles con los mismos medios sin colorante, controles que han sido sometidos a idénticas condiciones que la de los tubos objeto de estudio. El Stafilococo ha sido inhibido por una dilución del 1 por 5000 al 1 por 250000, dependiendo la diferencia de la muestra de colorante empleada y de la raza probada: en *general* he observado una más gran sensibilidad por parte de los Stafilococos virulentos procedentes de antrax, septicemias, ósteomielitis, etc., mientras que la menor sen-

sibilidad a correspondido casi siempre a gérmenes banales: stafilococos del aire y del agua.

Los bacilos diftéricos ensayados han resistido más que los pseudo-diftéricos (Corynebacterias: cutis y comunis), llamándonos la atención el hecho de que precisamente los pseudos son gérmenes intensamente GRAM positivos con los cuales se puede prolongar impunemente el intento de decoloración por el alcohol mientras que el bacilo diftérico siendo GRAM positivo no resiste, sin embargo, la acción del alcohol muy prolongada. Este es uno de los hechos que he observado y que me inclinan a creer en el papel que la lipoproteína de SCHUMACHER juega en la sensibilidad a los colorantes.

Entre los gérmenes más resistentes hemos visto que según los trabajos de muchos autores, es el bacilo COLI, que según ellos, resiste más que el bacilo de EBERTH. Muy al contrario yo he obtenido mis resultados: el bacilo COLI uniformemente sea la variedad que se quiera, nos ha crecido dificultosamente en los medios de cultivo que contenían el violeta de genciana a 1 por 7000 y 1 por 7200, mientras que los bacilos de EBERTH ensayados han crecido bien en presencia del violeta, incluso al 1 por 5000 y aún más fuerte. Es decir, que el bacilo tífico ha crecido en medios intensamente coloreados en violeta mientras que los sensibles GRAM positivos no lo hacen frente a diluciones absolutamente incoloras, dato que hace resaltar su fina sensibilidad o la potencia del antiséptico. Resulta, pues, el violeta de genciana ante los GRAM positivos de una potencia no superada por ninguno de los antisépticos químicos habituales.

Una vez en posesión de estos datos, proseguí mis investigaciones, comprobando las variaciones que la presencia de albúminas, en especial de sangre, ocasionaba en el poder antiséptico de los colorantes.

Efectivamente, tal como señalaron varios autores la presencia de sangre en el medio coloreado disminuye grandemente el poder del elemento activo. El suero es de una acción mucho más débil que los elementos figurados de la sangre, los cuales, por su presencia disminuyen en notables proporciones el poder anti-microbiano del colorante. Motivado por este hecho cuando hemos querido obtener un efecto inhibitor en presencia de sangre o de cualquiera de sus componentes, nos vemos obligados a aumentar mucho la concentración del colorante. Pronto observé que la acción de la sangre o de sus componentes es, en condiciones uniformes de experimentación, proporcional a la cantidad presente. Así la dosis mínima activa de un colorante en presencia de albúminas se dobla si también es doble la cantidad de albúmina presente.

Esto nos llevó a efectuar un estudio en que creemos nadie se ha iniciado, ya que la bibliografía no nos demuestra lo contrario. Teniendo en cuenta que el conocimiento de las dosis de colorante fijadas por las albúminas disueltas en el suero y por los elementos figurados de la sangre podía tener una importan-

cia suma en el estudio de las dosis a emplear en terapia humana, abordamos este punto.

El hallar un método más o menos exacto pero que permitiera calcular con error suficientemente pequeño la cantidad de colorante que fija el suero sanguíneo, me pareció abordable intentando fijar el colorante sobre las albúminas y luego por un procedimiento a escoger eliminar éstas y por colorimetría dosando el colorante persistente en el líquido restante, conocer por diferencia la cantidad de colorante unido a las albúminas y eliminado con ellas.

Primeramente pensamos en hacer obrar el violeta de genciana, el cual, dicho sea de paso, se fija instantáneamente sobre la albúmina, sobre el suero y luego precipitar las albúminas contenidas en éste para someter al dosaje colorimétrico comparativo con un control el líquido sobrenadante; la precipitación de la albúmina podía hacerse por el calor, por los ácidos, etc., pero operando sobre suero no diluído tropezábamos con la dificultad de que es difícil recoger bien el líquido deseado. Pasamos a operar, pues, con suero diluído y luego de varios ensayos, se halló que las diluciones del suero que mejor nos convenían eran las de 1:2 hasta 1:5. En estas condiciones nos encontramos con el inconveniente de que el suero así diluído aunque lo sea con un electrólito (suero fisiológico) coagula difícilmente, precisándose la presencia de dosis algo altas de ácido. La elección de éste dió lugar a una serie de pruebas, ya que muchos de ellos son inservibles para este fin, ya que bajo la acción del calor destruyen el colorante sin que pueda éste regenerarse por una adecuada corrección o alcalinización. Los ácidos orgánicos tales como el ácido acético y el tricloroacético que creíamos serían más útiles que los otros nos resultaron francamente inservibles..

Finalmente, dejamos establecidas dos técnicas que expondremos prácticamente. El suero sujeto a la investigación se diluye a la mitad o más, luego precipitamos (aunque no teóricamente se precipitan en la práctica la casi totalidad de proteicos) las albúminas con ácido clorhídrico gota a gota hasta que no se forme más precipitado y quedando el contenido del tubo o recipiente de color verde claro; filtramos por papel después de haber anotado el volumen total conseguido después de la acidificación; del líquido obtenido se toma una cantidad conocida que se somete a la alcalinización por una solución normal de hidróxido sódico, operación que debe efectuarse cuidadosamente, ya que al regenerarse paulatinamente el color original del colorante pasa por un momento óptimo, que es el deseado, para luego palidecer bajo la acción de la sosa en exceso. Obtenido el punto óptimo se efectúa la anotación del nuevo volumen conseguido y se compara el color en el colorímetro con el de un adecuado control. Nosotros operamos con un control que se somete a idénticas operaciones que el tubo que lleva el suero humano substituyendo a éste un volumen igual de suero fisiológico. Esto debidamente aprovechado por quien conoce la técnica colorimétrica simplifica mucho los diferentes cálculos exi-

gidos para conocer la cantidad de colorante fijada por las proteínas y con éstas precipitadas.

La segunda técnica utilizada ha sido la de hacer actuar el colorante (hemos operado siempre con el violeta de genciana) sobre el suero a partes iguales y luego precipitar por una cantidad diez veces mayor al conjunto suero-colorante con el alcohol absoluto. Luego se filtra y se pasa directamente al colorímetro. Esta técnica es, pues, muchísimo más simple en sus cálculos, especialmente por operar sobre volúmenes exactos sin fracciones que la acidificación y la regeneración del color (no exigida por la técnica alcohólica) dan de sí.

Estas técnicas pueden ser combatidas por distintos puntos, como son la no total precipitación de los proteicos, que por la ínfima cantidad que escapan no tiene gran valor, siendo la segunda objeción el error causado en la tonalidad del color por los pigmentos séricos que puedan haber llegado al líquido que se lleva al colorímetro, pero eso se puede corregir por comparación mediante adopción de un dispositivo colorimétrico derivado del bloque de WALPOLLE. No hemos encontrado aún ningún suero que nos haya exigido esta operación, aunque pueda ser posible con sueros ictericos u otros.

Un detalle al que damos importancia y que no queremos dejar de citar es el de la concentración de colorante a escoger en estas pruebas. Personalmente hemos hallado la concentración óptima para su lectura en el colorímetro entre 1 por 10000 y 1 por 50000, debiéndose procurar pues, que la solución final esté entre estos límites.

Operando así hemos obtenido cifras de retención del violeta de genciana por las albúminas del suero idénticas o muy próximas con los dos métodos.

Hemos probado sueros de distintas especies animales, pero los ensayos han llevado preferentemente sobre el suero humano, para el que hemos hallado una cifra de retención de 0'00004 gramos de violeta por las proteínas de 1 c. c. de suero *perfectamente límpido* sin proteínas procedentes de la lisis glóbular.

Así, pues, cada litro de suero sanguíneo en el hombre retiene unido a sus proteínas 4 centigramos de violeta.

La técnica para el estudio de la fijación que los elementos figurados (hematíes, leucocitos y plaquetas) efectúan ante el colorante nos ha parecido desde un principio como extremadamente fácil debido a la eliminación de dichos elementos por centrifugación. El violeta ha sido empleado en solución con suero fisiológico, cosa indispensable aquí, y no se ha manifestado como hemolítico. Así, pues, se ponen en contacto los glóbulos (muy bien lavados mediante centrifugaciones) obtenidos de 1 o más centímetros cúbicos de sangre en contacto con un volumen conocido de violeta al 1 por 5000 o al 1 por 50000, se agita y se centrifuga. El líquido transparente que sobrenada se manifiesta ya a simple vista mucho menos coloreado que el respectivo control. Se lleva al colorímetro y se

comparan el líquido sobrenadante con el control. El cálculo aquí es simple en extremo.

Nosotros hemos hallado que los elementos figurados humanos correspondientes a un c. c. de sangre retienen 0'000554 gramos de violeta de genciana, cifra muchísimo mayor que la correspondiente al suero sólo y que da más de medio gramo para los elementos figurados presentes en un litro de sangre.

Estos datos nos sugieren muchos comentarios.

Ante todo, resaltan como insuficientes las dosis de 5 y de 7 miligramos por kilogramo de peso señalados por tantos autores, si es que pensamos que dentro el cuerpo vivo ocurren los hechos como dentro el tubo de cultivo. Pero no es este nuestro parecer. Creo fundado mi parecer de que el colorante fijado a raíz de su inyección sobre los hematíes, leucocitos, etc., pueda, bajo las muy distintas condiciones físico-químicas que la sangre atraviesa, liberarse y fijarse entonces sobre los gérmenes circulantes, o a cuyo contacto llega. También es admisible que los leucocitos de enorme afinidad para los colorantes básicos como el violeta de genciana se utilicen bajo su acción lo cual explicaría la baja de la cifra leucocitaria que sucede a la inyección intravenosa del colorante y que también podría explicarnos un nuevo mecanismo de destrucción microbiana por los fermentos liberados en la autólisis de los leucocitos.

En resumen me parece justificado admitir interinamente en el terreno de las hipótesis tres mecanismos de acción del violeta: la unión directa del colorante con las bacterias que en el momento de la inyección y antes de su unión con las proteínas plasmáticas y celulares, la unión por una posible reversibilidad de la unión colorante-proteína reversibilidad imposible *in vitro*, pero posiblemente verdad *in vivo*, y finalmente una acción indirecta debida a la liberación de fermentos leucocitarios.

* * *

En el terreno clínico, poseemos muchas observaciones que nos llevan a preferir en los procesos estreptocócicos, estafilocócicos y pneumocócicos el violeta de genciana sobre todos los demás productos que el comercio ha divulgado. Cierto es que es molesto su uso por su enorme poder tintóreo, pero no le creemos suficiente a este motivo para posponer su uso.

Varias streptocemias que habían resistido a todos los productos han sido yuguladas por nosotros con tres o menos inyecciones de violeta de genciana.

Los productos que en el comercio se encuentran toman importancia sobre el violeta en determinadas infecciones causadas por ciertos GRAM negativos, que como por ejemplo, el gonococo, son sensibles a su acción.

Uno de los productos más en boga y que menos resultados nos ha dado es el mercurocromo. Este agente, eficaz indudablemente en algunos casos, fracasa en muchísimos. Las dosis a administrar no pueden ser altas ya que sobreviene bastante fácilmente albuminuria, cosa ésta que ningún otro de los colorantes utilizado por nosotros ha causado.

En una serie de casos septicémicos con stafilococos o streptococos con punto de partida óseo (osteomielitis, osteítis, periostitis) hemos efectuado repetidos hemocultivos que nos han dado constantemente el mismo germen; efectuando luego una inyección de colorante por vía venosa a dosis alta y procediendo una hora más tarde a la práctica de un nuevo hemocultivo hemos hallado que los inyectados previamente con mercurocromo dan muy frecuentemente hemocultivo positivo a pesar de la inyección inmediata anterior, también puede suceder esto con los que han recibido acriflavina, tripaflavina, etc., pero no hemos podido obtener un hemocultivo positivo después de una inyección de violeta de genciana a dosis alta.

Entre los casos que mejor nos han respondido al tratamiento por el violeta, hemos de citar las endocarditis streptocócicas hemolíticas o viridans, en cuya enfermedad creemos es el tratamiento de elección si queremos combatir la causa. Un solo caso de endocarditis con insuficiencia de la mitral de curso agudo febril con las apariencias clínicas de una localización reumática, con hemocultivos repetidamente negativos fué curada sin secuelas por una serie de inyecciones de violeta de genciana.

En ciertas streptococias de la piel hemos obtenido curaciones rápidas.

El tratamiento por el violeta manifiesta prontamente sus efectos. Si el tratamiento puede influir favorablemente el caso desde la primera inyección se aprecia una *baja brusca e intensa* de la temperatura pocas horas después de la inyección, baja que en afortunados casos persiste y la infección queda yugulada, pero que en la generalidad de los casos es temporal ya que la curva asciende nuevamente unas 12 horas después sin alcanzar por lo general las alturas a que hubiere llegado antes de la inyección. Entonces no esperamos 48 horas como muchos indican, sino que efectuamos una nueva inyección a la misma dosis o más alta aún (sin que hayamos tenido nunca efecto desagradable alguno) a las 24 horas. La temperatura baja nuevamente y entonces si remonta damos la tercera a las 48 horas después de la segunda.

Si las cifras máximas de temperatura remontan a pesar de la tercera inyección es muy posible el fracaso y sólo el estado general del enfermo, su pulso, etc., nos indicarán si debemos persistir o abandonar esta vía terapéutica.

Uno de los efectos más rápidos en el caso de ser eficaz el tratamiento es la sensación de bienestar que experimenta el enfermo tomando su plaza a la angustia y malestar profundo que las septicemias por gérmenes GRAM positivos dan.

Entre las infecciones localizadas que hemos sometido al tratamiento por el violeta se encuentran las pleuresías, que en general han respondido muy bien a los lavados intra-pleurales de violeta a 1 por 50000, siendo esta aplicación una derivación del tratamiento que con tanto éxito emplea CURCHMANN en las infecciones intra-articulares (véanse sus tra-

bajos en los *Jour. of the Amer. Med. Ass.* de los últimos quinquenios). Las localizaciones urinarias a gérmenes GRAM positivos que hemos podido tratar han sido solamente dos casos de pielonefritis por bacilos difteroides que con un tratamiento prolongado han presentado fases de franca mejoría, pero cuyo curso, muy accidentado, prívamos de sacar una consecuencia neta y prudente. Recordemos que las infecciones altas del aparato urinario por bacilos difteroides son muy frecuentes y que todos los medios terapéuticos, entre los que prevalece la auto-vacunoterapia, fracasan a menudo al par que dan en otros casos éxitos francos.

En fin, entre los procesos que no hemos podido estudiar y que nos proponemos someter a la terapia colorante, se hallan la escarlatina, la parotiditis y otras en las cuales un buen resultado tendría una cierta importancia en las discusiones que sobre su etiología se sostienen.

Al hablar de las dosis, debemos manifestar nuestra opinión completamente favorable a las altas dosis. Estas son generalmente calculadas entre los 5 y los 7 miligramos de violeta para cada kilo de persona inyectada, lo que corresponde como máximo a 0'49 gramos para una persona de 70 kilos, lo cual lleva al violeta a una dilución de cerca del 1 por 10000 en la sangre, si aceptamos que esta suma, 5 litros en una persona de dicho peso; a dicha dosis la dilución final que se puede calcular para el violeta en relación a la masa total del cuerpo es de 1 por 143000 aproximadamente. La inyección de dosis de 7 miligramos por kilo daría una dilución final suficientemente intensa para esterilizar en el acto a todo el cuerpo ante la mayoría de los microorganismos GRAM positivos, si nuestro cuerpo parasitado se comportara simplemente como un caldo germinado. Hemos visto ya las diferencias que la presencia de proteínas causa en la acción de los colorantes y salta a la vista que en el cuerpo humano hay que contar con muchas más causas de error desconocidas aún para nosotros. Ahora bien, si aceptamos una estrecha similitud entre lo que pasa en el medio de cultivo al que añadimos proteínas y el cuerpo humano, nos encontramos con que las dosis que se aceptan en la terapia colorante es más que insuficiente, ya que según nuestros cálculos expuestos anteriormente, un hombre de 70 kilogramos con 5 litros de sangre retendrá fijados a las proteínas y elementos figurados de su sangre 2'19 gramos aproximadamente de violeta genciana, dosis que por ahora no ha sido administrada a nuestro saber. Aún en realidad, deberíamos tener en cuenta la fijación del colorante por los demás elementos histológicos del cuerpo, tales como los endotelios vasculares, los tegumentos externos y mucosas. El hecho de aparecer (en las experimentaciones sobre animales) la coloración violeta de las mucosas a partir de dosis algo más altas de 10 miligramos por kilogramo nos demuestra la reversibilidad de la combinación del violeta con las proteínas de la sangre, ya que las dosis aún bastante más altas de 10 miligramos por kilogramo son capaces de ser fijadas

en su totalidad por la sangre, y el hecho de aparecer con dichas dosis la coloración de las mucosas indica la liberación del violeta bajo mecanismos desconocidos por ahora. Recuérdese que uno de los mecanismos de acción del violeta de genciana que aceptamos es el de la liberación del colorante unido a los elementos de la sangre. Es una de las formas de explicar la clara acción terapéutica de dosis relativamente pequeñas de colorante. Quizá la reversibilidad de la unión del colorante con las albúminas sanguíneas pueda asemejarse a lo que ocurre en química con la unión del nitrato argéntico y del cromato potásico con formación de cromato argéntico, unión que se deslía en presencia de cloruro de sodio, formándose entonces cloruro de plata. Es la ley de las afinidades. Así, pues, en la sangre circulante en el seno del cuerpo humano es comprensible que el colorante unido a las albúminas pase de ellas a las bacterias en cuanto se hallen todos dichos elementos en presencia. Sólo hemos de recordar que los colorantes básicos poseen una afinidad discreta para las albúminas, mientras que la poseen enorme para las bacterias.

Para concluir comunicaremos que nuestras dosis para una persona de 70 kilogramos son de 0'30-0'45 gramos en la primera inyección como prueba o para obrar con suma prudencia, excepto en el caso de un estado gravísimo del enfermo, en cuyo caso damos ya nuestras dosis máximas desde el comienzo. La segunda, dada a las 24 horas, la subimos a 0'50-0'75 gramos o más, siendo nuestra dosis máxima, de la que no hemos pasado por ahora, la del gramo; sin que esta dosis que a muchos puede parecer brutal nos haya dado preocupación alguna. La única razón que nos da que temer en las dosis, es el ya dicho factor de la variabilidad química de los violetas. Dicho esto recordaré solamente el caso relatado por MARK y OLESTER: en el Hospital Wieden, de Viena, y debido a una equivocación se dió a un enfermo intravenosamente y sin accidentes secundarios (recordemos aquí los accidentes por fotosensibilización que ocasionan a veces los compuestos acridínicos) una dosis única de 2 gramos en lugar de 0'20 gramos. El enfermo curó con esta sola inyección. A pesar de ello, MARK y OLESTER, después de reconocer la ineficacia e inofensividad de las dosis altas, aconsejan la de 0'1 gramo por kilo.

Debemos excusar nuestra brevedad, quizás excesiva, en los comentarios de los hechos clínicos, así como en su exposición. Debida es a nuestro mayor interés por los hechos puramente bacteriológicos, y creemos corresponde a nuestros clínicos eminentes el efectuar el estudio de estas cuestiones en lo que a la clínica atañe, fundándose sí en los datos y concepciones que el laboratorio sugiere. Para finalizar, réstanos agradecer las facilidades que complacientes compañeros nos han dado para disponer en casos interesantes en los cuales actuar. Sea, pues, para los doctores J. ARMANGUÉ, M. CORACHÁN, C. OLIVÉ y V. COMPAÑ y todos los demás cuya ayuda hemos recibido, nuestro reconocimiento.

RESUME

La thérapeutique par les produits colorants et ses semblables est encore à ses commencements, mais elle a déjà laissé prévoir le brillant avenir qu'elle aura. Parmi les colorants employés au laboratoire les plus intéressants sont les anilines basiques dont le pouvoir microbicide est très supérieur à celui des autres colorants. Les colorants ont des pouvoirs très diverses et il y a en outre une grande différence parmi les colorants eux-mêmes selon leurs marques et encore parmi celles-ci.

Il y a des colorants telle la violette de gentiane, à la composition clinique très variable, tandis que d'autres produits, pour le fait d'être cristallisés, tel le Kristal-violette, sont beaucoup plus fixes dans leur composition.

Les colorants d'action la plus intéressante sont les colorants sélectifs qui agissent de préférence et avec un très grand pouvoir sur les germes GRAM positifs.

Il y a des colorants qui sont plus puissants que la plupart des antiseptiques employés, ce qui joint à leur innocuité qui permet l'administration des doses élevées constitue vraiment un espoir.

Les colorants sont beaucoup plus actifs en absence des protéines qu'en leur présence.

Le fait antérieur qui peut exercer de l'influence sur l'action des colorants in vivo ne peut pas se classer au même rang quand il est in vitro (matière morte) que quand il survient in vivo (matière vivante).

La plupart des colorants dérivés acridiniques, les auramines et les produits photosensibilisateurs agissent mieux que les anilines basiques en présence des protéines, mais ils ne sont pas autant innocus que les anilines (des effets secondaires: coup de soleil acridinique).

Parmi les plus connus et les plus employés de ces produits on trouve le mercurechrome qui, entre nos mains s'est montré moins actif qu'entre celles d'autres, et qui a facilement causé des albuminuries ce qui limite son emploi.

On obtient des hémocultures positives même à la suite d'une injection de certains colorants commercialisés, chose que nous n'avons jamais constatée avec les anilines basiques que nous employons.

Parmi tous les colorants, celui que nous préférons est la violette de gentiane.

Nous avons obtenu des techniques convenables pour le dosage des quantités de violette de gentiane retenues par les protéines et les éléments figurés du sang.

À la faveur de ces méthodes nous avons démontré que les protéines du sérum sanguin humain signalent 0.04 grs. par litre de sérum. Les éléments figurés d'un litre de sang signalent 0.55 grs.

Malgré les nouveaux produits, on ne peut pas combattre les infections causées par des germes GRAM négatifs avec autant d'efficacité que celles qui sont causées par des germes GRAM positifs.

L'injection de violette de gentiane doit être toujours intraveineuse car toute autre voie est scarifiante et douloureuse. L'injection est suivie d'une baisse assez remarquable de la chiffre leucocitaire, due probablement à l'action toxique de la violette sur les leucocytes, qui cependant sont vite régénérés par l'activité des organes producteurs stimulés par l'infection elle-même.

Nous pouvons accepter sous trois formes le mécanisme d'action de la violette de gentiane: action directe de la violette sur les germes qui la fixent immédiatement après l'injection, réversibilité de la combinaison protéines-violette qui délivre par degrés le colorant. Celui-ci se joint à son tour à la bactérie qu'il doit rendre inactive. La troisième forme est: action des ferments leucocitaires délivrés par la lyse des leucocytes inutilisés par la violette très toxique pour ces éléments.

On peut arriver impunément à des doses très élevées de violette, d'autant plus efficaces qu'elles sont plus élevées.

Il y a un grand nombre d'infections qui peuvent guérir sous l'action de la violette et on trouve au premier rang l'endocardite streptococcique dans laquelle l'action de la violette est le traitement causal d'élection.

SUMMARY

The therapy through colouring products and its affinities still initiates beginning but it has already been clearly manifested there is a bright future awaiting for it. Among the dyes used in the laboratory the most interesting are the basic anilins whose microbicidal power is far superior to the others. Dyes possess very distinct power and there is also a great difference among said dyes according to their make and even within one same make.

There are dyes like the violet gentian of very varied chemical composition while others being crystallized products, like the kristal-violet, are much faster in their composition.

The selective dyes are more interesting in their action which act upon the positive GRAM germs with preference and powerfully. More powerful than most antiseptics employed are some dyes which along with their innocuity, allowing the administration of large doses, give us great hopes.

Dyes are much more active in the absence of proteins than when these are present.

The above fact which may be of influence upon the action of dyes in vivo we believe cannot be compared when occurring in vitro (dead matter) to the occurrence in vivo (living matter).

The greater part of dyes derived acridinic, auramins and photosensibilizer products are better than basic anilins in the presence of proteins but are not so innocuous as those (secondary effects: stroke of acridinic sun).

Among the best known and more used of these products is the mercurychromin which in our hands has proved less active than in many other hands and which has caused easily albuminuria which restricts its employment.

Positive hemocultures are obtained even after injecting certain dyes to be found in the market, a thing which has not happened to us with the basic anilins employed by us.

Among all dyes we prefer the violet gentian.

We have obtained an adequate technique for the dosage of the quantities of violet gentian retained by proteins and figured blood elements.

As favouring these methods we have shown that the protein fixation of the human blood serum is 0.04 gm, per litre of serum. The figured elements fixation of a litre of blood is 0.55 gm.

In spite of all the new products the infection through negative GRAM germs are not attacked with such great efficacy as those caused by positive GRAM germs.

Injection of violet gentian should always be intravenous as any other way is both scarifying and exceedingly painful. It is followed by a very remarkable lowering of the leukocyte count, probably due to the toxic action of the violet upon the leukocytes which nevertheless soon regenerate through the activity of the productive organs stimulated by the infection.

The mechanism of the action of the violet gentian can be accepted in three ways: direct action of the violet upon germs which fix it from the time of injection; reversibility of protein-violet combination which gradually liberates the dye which in its turn joins the bacteria to be inactivated, and finally action of the leukocyte ferments liberated by the lysis of the destroyed leukocytes though the violet which is exceedingly toxic for these elements.

Very high doses of violet can be reached and the higher the more efficacious they are.

Many infections can be cured under the action of the violet, the streptococcic endocarditis being one of the first, where it is the causal treatment of choice.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Heilkunde mit den Farbstoffprodukten und ähnlichen ist noch im Anfang begriffen, aber sie hat schon deutlich die brillante Zukunft die sie erwartet, gezeigt. Zwischen den in den Laboratorien gebrauchten Farbstoffen sind die basischen Anilinfarben deren mikrobentötende Kraft alle anderen übertrifft, am interessantesten. Die Farbstoffe be-

sitzen sehr verschiedene Kräfte und ist auch ein grosser Unterschied zwischen den Farbstoffen selbst je nach ihrer Marke und selbst auch noch in diesen.

Es gibt Farbstoffe, wie das Genzian-violett, von sehr unbeständiger chemischer Zusammensetzung, während andere, da sie kristalisierte Produkte sind, wie das Kristal-violett, in ihrer Zusammensetzung bedeutend beständiger sind.

Die in ihrer Wirkung am interessantesten Farbstoffe sind die selektiven, die vorzüglich wirken und mit einer sehr grossen Gewalt über die positiven Keime GRAM.

Mächtiger noch als die meisten gebrauchten Antiseptiken sind einige Farbstoffe, die, vereint mit ihrer Unschädlichkeit, die Verabreichung grösserer Dosis erlauben und sind diese also eine grosse Hoffnung für alle.

Die Farbstoffe sind bei Abwesenheit von Protein viel aktiver als bei seinem Vorhandensein.

Die vorhergesagte Tatsache, die in der Wirkung *in vivo* der Farbstoffe, grossen Einfluss haben kann, glauben wir kann sich nicht vergleichen, wenn sie *in vitro* (tote Materie) oder wenn sie *in vivo* (lebende Materie) geschieht.

Der weitaus grösste Teil der abgeleiteten akridininen Farbstoffe, Aurarinen und photoempfindliche machende Produkte wirken bei Vorhandensein von Protein besser als die basischen Aniline, aber sie sind nicht so unschädlich wie jene (nebensächliche Wirkungen: akridininer Sonnenstich.)

Zwischen den am meisten bekannten und gebrauchten Produkten befindet sich das Quecksilberchrom, dass sich in unseren Händen weniger aktiv als in anderen Händen gezeigt hat und hat sehr leicht Brightsche Krankheiten verursacht und setzt dies natürlich seinen Gebrauch herab.

Positive Bluthreibungen erhält man noch nach Einspritzung gewisser in den Handel gebrachter Farbstoffe, eine Sache die uns mit den von uns gebrauchten basischen Anilinen nicht passiert ist.

Das Genzian-violett ist der von uns am meisten bevorzugte Farbstoff.

Wir haben Techniken erreicht, die geeignet sind, für die Dosierung von den Genzian-violett Mengen, von dem Protein und von den figurirten Brutelementen zurückgehalten.

Zu Gunsten dieser Methoden haben wir bewiesen, dass die Proteine der menschlichen sanguinischen Lymphe 0.04 Gramm für den Liter Lymphe festsetzen. Die figurirten Elemente eines Litres Blutes setzen 0.55 Gramm fest.

Trotz aller neuen Produkte sind die Infektionen durch negative Keime GRAM nicht mit so grosser Wirksamkeit bekämpft als die positiven Keime GRAM.

Die Einspritzung von Genzian-violett muss immer in die Adern geschehen, da irgend ein anderer Weg immer schropfend und sehr schmerzhaft ist. Ihr folgt immer sofort eine bedeutendes Fallen der Anzahl der weissen Blutkugeln, jedanfalls durch die giftige Tätigkeit des violetts auf die weissen Blutkugeln, die sich jedoch bald wieder durch die Tätigkeit der durch die Infektion selbst angeregten Erzeugungs-organa, neugestalten.

Den Tätigkeitsmechanismus des Genzian-violetts können wir in drei Formen annehmen: die direkte Wirkung des violetts auf die Keime die sie auf Grund der Einspritzung bestimmen, Rückfälligkeit der Protein-violetts Verbindung, welche den Farbstoff allmählich befreit, der sich seinerseits mit der Bakterie vereint die er inaktiv machen soll, und schliesslich, Wirkung der weissen Blutkugelnfermenten, durch die Lysis der weissen Blutkugeln befreit, die durch das violett unbrauchbar gemacht, welches höchst giftig für diese Elemente ist.

Man kann ungestraft zu sehr hohen Dosis violett kommen, die wirksamer sind, je höher sie sind.

Viele Infektionen können unter der Wirkung des violetts heilen und zwischen ihnen ist die streptokokische Entzündung der inneren Herzhaut, wo die kausale Behandlung nach Wahl geschieht.