ESTUDIO BIO-QUIMICO DE LA REACCION DE WEIL-FELIX.

COMUNICACION PRELIMINAR.

Por el Dr. Hermann Mooser.

Entre los conocimientos más importantes en la conquista del tifo, (aparte del conocimiento de su agente causal y de sus vectores) se cuenta la reacción de Weil-Felix. Acerca del descubrimiento de esta reacción los autores nos relatan lo siguiente: Durante el mes de septiembre de 1915 examinaron bacteriológicamente muchos casos diagnosticados como fiebre tifoidea, entre la tropa austriaca que peleaba en la Galicia Oriental. Les llamó la atención que de ninguno de los casos pudieran aislar el bacilo de Eberth, y empezaron a dudar del diagnóstico clínico de fiebre tifoidea. De sangre y orina de algunos de esos casos aislaron gérmenes del grupo Proteo, que eran aglutinados por la sangre de los enfermos. La cepa más aglutinable era la X 19. Se reveló pronto que los enfermos cuya sangre aglutino este bacilo padecían tifo exantemático. La especificidad del bacilo X 19 frente a los sueros de los tifosos se comprobó luego en la mayoría abrumadora de los casos: se había descubierto un medio de diagnóstico específico del tifo exantemático. Cuando Weil y Felix hallaron la variante 0 del X 19, el porcentaje de reacciones positivas subió al 100% de los tifosos, y desde entonces tenemos en esta reacción una que sobrepasa a todas las reacciones serológicas para diagnóstico de alguna enfermedad infecciosa. Natural era que un germen que tiene reacción tan específica con el tifo se considerara en el principio como el causante de la enfermedad. En realidad Friedberger llegó a esta conclusión, en tanto que los descubridores mismos se mostraron muy escépticos desde el principio. Las conclusiones de Friedberger han sido rechazadas por la mayoría de los investigadores subsiguientes. He aquí las razones para descartar al bacilo X 19 como agente causal del tifo: 1) Animales vacunados precisamente con este bacilo no acusan ni la menor inmunidad contra el virus tifoso; 2) Animales inmunes al virus tifoso por inoculación previa no son inmunes al X 19, que es muy virulento y tóxico pa-

ra los animales de laboratorio; 3) el cuy nunca desarrolla reacción de Weil Felix a pesar de ser muy susceptible al virus tifoso y a pesar de formar aglutininas contra el bacilo X 19 cuando se le inocula con bacilos muertos o con dosis submortales del mismo bacilo vivo; 4) es sumamente reducido el número de casos de tifo humano y de animales inoculados experimentalmente en los que se logró aislar el bacilo X 19. Revela mejor esta última circunstancia el hecho de que en todos los laboratorios del mundo se usa la cepa aislada originalmente por Weil y Felix para el diagnóstico del tifo exantemático.

Las cepas de proteo X 19 tienen dos variantes, H y O; la H es muy móvil, forma filamentos largos y su cultivo se extiende difusamente sobre medio de gelosa, opacándolo. La variante O forma colonias aisladas, bien circunscritas que nunca tienden a extenderse sobre el medio de cultivo. Las cepas aisladas originalmente por Weil y Felix fueron todas de la variante H, y la O se derivó de ellas en el curso de trasplantes sobre medios sólidos. Sólo la variante O se usa para la reacción de Weil Felix porque el suero sanguíneo de los tifosos solamente contiene aglutininas contra la substancia O y no contra la H.

El estudio serológico de los proteos X 19 reveló que las variantes H contienen dos antígenos distintos: el antígeno o aglutinógeno H, que corresponde a la parte flagelar del bacilo móvil, y el antígeno o aglutinógeno O que corresponde a la parte corporal del bacilo. La variante O, pura, solamente contiene el antígeno o aglutinógeno O; esta variante es inmóvil y no tiene flagelos. El antígeno H es termolabil, mientras que el antígeno O resiste el calentamiento a 100° C si no se dispone de una cepa O pura, sino de una que contiene el componente H, es preciso calentar el cultivo a 100° C para destruir esta substancia H, que interfiere con la aglutinación de la O por los sueros tifosos.

Todos los proteos comunes, (el proteo vulgar, por ejemplo) contienen el antígeno H, pero carecen, estos gérmenes, de la substancia O, específica, que reacciona con los sueros de tifosos. La denominación X quiere decir que los gérmenes reaccionan específicamente con esos sueros.

Por la prueba de aglutinación es fácil distinguir las dos formas de aglutinógenos. El antígeno O aglutina en forma de gránulos finos, mientras que el antígeno H lo hace en forma de copos que fácilmente se disgregan al agitar los tubos. Por estos caracteres de

la aglutinación pudo Felix diferenciar dos veces infecciones humanas producidas por bacilos proteos, de infecciones tífosas, pues en las dos ocasiones los sueros de los enfermos solamente contuvieron aglutininas de tipo H y no del O, que son las únicas específicas del tifo.

Hasta ahora no se tiene todavía explicación satisfactoria para el hecho de que los sueros tífosos aglutinen con tanta regularidad y a títulos muchas veces elevadísimos, los bacilos de Weil y Felix. Hay varias hipótesis a este respecto. Una de ellas, de muy poca aceptación, dice que el suero de los tífosos adquiere propiedades poli-aglutinantes no específicas contra una gran serie de gérmenes por un aumento grande de globulinas lábiles fácilmente perceptibles: contra el proteo, el bacilo de Plotz, el bacilo de Coli U2 de Wilson y contra ciertas cepas del piocianico aislado de material de tífosos. Felix mismo ha descartado esta hipótesis al demostrar que el suero de tífosos contiene aglutininas específicas solamente contra los proteos X y que el suero de tífosos aglutina los gérmenes arriba mencionados a títulos no más altos y no con más frecuencia que sueros de personas normales. Se trata simplemente de normo-aglutininas y no de inmuno-aglutininas.

Otra hipótesis pretende que las aglutininas antiproteos de los sueros tífosos se deben a una infección concomitante con bacilos proteos, como sucede, por ejemplo, en la peste porcina, en el curso de la cual el organismo es invadido por bacilos paratíficos que originan aglutininas contra ellos. Esta hipótesis tampoco es sostenible por el simple hecho de que el proteo X 19 ha sido aislado de tífosos, solamente muy pocas veces y sobre todo por la circunstancia de que los sueros tífosos nunca contienen aglutininas de tipo H, lo que se debiera esperar si la reacción de Weil Felix procediera de una infección secundaria por proteos. Tampoco se explica con esta hipótesis que todos los animales susceptibles al tifo den reacción de Weil Felix positiva, mientras que el cuy, a pesar de ser también susceptible, no la da, y es, además, susceptible a los proteos y puede producir aglutininas contra los X 19 cuando se le inocular con ellos. Por último, esta hipótesis no explica por qué la inyección de rickettsias muertas engendra Weil Felix positivo.

Otra explicación nos ofrece Otto, del Instituto Roberto Koch. Este autor quiere explicar la reacción de Weil Felix como una para-aglutinación. La para-aglutinación es un fenómeno que se ha obser-

vado por primera vez en las disenterías. Ciertos micro-organismos de la flora intestinal adquieren la propiedad de ser aglutinados por los sueros de los disentéricos, igual que los bacilos disentéricos que causaron la disentería. Según Otto, lo mismo pasaría en los tifosos en los que los proteos normales, en contacto con el virus tifooso en el organismo, adquirirían una nueva propiedad, la de la substancia 0X que reacciona específicamente con los sueros de tifosos. Esta hipótesis de Otto tampoco tiene mucha aceptación porque la propiedad para-aglutinante de gérmenes concomitantes en las disenterías se pierde rápidamente en generaciones subsiguientes de los gérmenes, mientras que el proteo X 19 retiene indefinidamente la propiedad específica frente a los sueros de tifosos; se trata de una propiedad genérica de estos gérmenes.

Una última hipótesis defendida tenazmente por Felix y por la escuela polaca es que el proteo X 19 es un derivado de la rickettsia *prowazeki*, un producto de mutación del germen específico del tifo. Esta mutación ya no tendría el poder de producir la enfermedad, pero habría retenido el de aglutinar con los sueros de tifosos.

Las dos últimas hipótesis consideran, por consiguiente, la reacción de Weil Felix como una verdadera inmuno-reacción específica; la primera al postular la adquisición de una substancia con tal calidad en el organismo del tifooso; la segunda al suponer la retención de este antígeno parcial específico a pesar de la mutación.

Ninguna de todas estas hipótesis satisface al inmunólogo. La más probable y completamente acorde con otras observaciones de la serología es la hipótesis de que la reacción de Weil Felix se debe a un antígeno hetero-genético en el organismo de la *Rickettsia prowazeki*, porque esta reacción aparece también en animales inoculados con rickettsias muertas.

Para mejor comprensión de los señores clínicos es preciso que dedique algunas palabras al concepto de antígenos hetero-genéticos, ilustrándolo con el ejemplo clásico del antígeno de Forssmann. Al inocular conejos con extractos acuosos de cuyo suero de los conejos adquiere la propiedad de hemolizar los glóbulos rojos del carnero, al igual que conejos inmunizados con glóbulos rojos del carnero mismo. Esta sustancia se ha encontrado en muchos animales; en otros falta completamente. La existencia o la falta de ella en un animal es de carácter genérico, es decir, todos los animales de una especie dada la tienen o no la tienen. Una substancia que engendra

el mismo fenómeno en los conejos es decir, que engendra lisinas contra los eritrocitos del carnero, se ha encontrado también en ciertos micro-organismos. A pesar de que en muchos animales y micro-organismos se encuentran estos antígenos hetero-genéticos (que engendran anticuerpos contra la sangre del carnero) estos antígenos no son totalmente idénticos. Eso es evidente por la observación de que las lisinas engendradas por el bacilo de Gartner, por ejemplo, pueden ser absorbidas del suero de conejo solamente por este mismo bacilo y no por emulsiones de órganos de cuy, los cuales, inoculados al conejo, también producen lisinas anti-carnero. Se trata de cuerpos químicos de constitución parecida o que contienen radicales parecidas, capaces de engendrar anticuerpos también parecidos, pero no totalmente idénticos. Sabemos por los trabajos de Karl Landsteiner sobre los antígenos artificiales complejos, que un parentesco químico de las sustancias acopladas con cuerpos albuminoideos engendran anticuerpos que abarcan todo un grupo de sustancias químicamente emparentadas.

Podemos pensar, por consiguiente, que la *Rickettsia prowazeki* contiene, entre otros antígenos que la caracterizan como tal, un antígeno de constitución parecida a una sustancia que también se encuentra en el proteo X 19.

Que esta hipótesis está sobre terreno científico firme lo revela el hecho de que el suero antineumocócico tipo II también precipita a altos títulos un polisacárido aislado de la goma arábiga.

En concordancia con tales ideas Ruiz Castañeda y Sia llegaron a la conclusión de que la reacción de Weil Felix se explica porque el proteo X 19 y la *Rickettsia prowazeki* contienen un antígeno común. El suero de tifosos, según ellos, contiene aglutininas principales contra la *Rickettsia prowazeki* y anticuerpos secundarios contra el proteo, mientras que el suero antiproteo contiene aglutininas principales contra el proteo y aglutininas secundarias contra la *Rickettsia prowazeki*. De un suero tifoso el proteo toma solamente las aglutininas antiproteo, dejando las antirickettsia intactas, mientras que del suero antiproteo toma las aglutininas antiproteo y antirickettsia. De un suero tifoso la rickettsia toma todas las aglutininas, antirickettsia y antiproteo, mientras que de un suero antiproteo la rickettsia absorbe solamente las aglutininas antirickettsia dejando intactas las aglutininas contra el proteo.

En una conferencia sustentada ante los delegados sanitarios del Departamento de Salubridad Pública, en julio del año próximo pasado, el Dr. Ruiz Castañeda amplió sus observaciones diciendo que la reacción de Weil Félix se explica ahora completamente por el hecho de que la rickettsia y el proteo X 19 contienen el mismo polisacárido. Desde entonces no ha vuelto a publicar nada sobre el asunto y no he podido averiguar si la aseveración tan rotunda se basó en investigaciones químicas precisas o simplemente en impresiones adquiridas por observaciones serológicas indirectas.. De todos modos fue la primera vez que se atribuyó la reacción de Weil Félix a una substancia química determinada, el polisacárido específico del bacilo X 19, aunque esa substancia todavía no se hubiera estudiado por métodos químicos.

Personalmente interesado en este asunto tan sugestivo, empecé, hace algunos meses, un análisis químico y serológico de los componentes del proteo X 19. Con mucho gusto expreso aquí mi profundo agradecimiento al Dr. Ernesto Cervera, Director del Instituto de Higiene, por haberme permitido realizar este estudio con material y aparatos de ese establecimiento. La parte técnica y serológica de los trabajos la realicé con la colaboración de mi buen amigo el Dr. Gerardo Varela.

Tengo que confesar desde luego que nuestro estudio está lejos de ser completo; todavía no es posible llegar a una conclusión precisa respecto a la substancia que da la reacción de Weil Felix con la sangre de los tíficos.

Esta comunicación es meramente preliminar y tengo la esperanza de poder molestar a ustedes con un estudio más completo en tiempo no muy lejano.

La cepa de proteo X 19 que usamos es una cepa H O, es decir, una que contiene el antígeno H y el O. La escogí porque da cultivo mucho más abundante que la O pura. Sembramos 100 cajas grandes, de 25 cm. de diámetro y al cabo de 48 horas emulsionamos el cultivo en cerca de dos litros de agua destilada estéril. Pusimos a refrigerar la emulsión hasta congelarla y al día siguiente la licuamos con rapidez poniendo el frasco en agua caliente; en seguida volvimos a congelarla. Repetimos tres veces este proceso con intención de desintegrar los cuerpos bacterianos. Después, por centrifugación, separamos la parte disuelta de la no disuelta. El líquido claro, ligeramente opalino, que se obtuvo, precipitó fuertemente con

suero antiproteo de cabra y algo menos fuertemente con suero de tifoso, de título alto, previa isotonzación con cloruro de sodio. El líquido dió reacciones fuerte de Biuret y de Molish, indicando la presencia de albúmina y de carbo-hidratos. La albúmina se precipitó entonces con el mínimo de ácido acético necesario para obtener precipitación masiva. Este precipitado, denominado fracción I, se disolvió en agua destilada ligeramente alcalina y se volvió a precipitar con ácido acético, y así cinco veces hasta que el líquido sobrenadante, después de una precipitación, ya no dió reacción de Molish, es decir, hasta que ya no hubo un carbo-hidrato fácilmente desprendible de la parte albuminoide. A pesar de esto la fracción protéica obtenida dió todavía fuerte reacción de Molish indicando la presencia de un carbo-hidrato íntimamente acoplado con la albúmina. No se ha investigado todavía si se trata de una mucina o de otra gluco-proteína o de un carbo-hidrato simplemente absorbido a la albúmina. Solamente pude averiguar que esta fracción I contiene el carbo-hidrato en forma de polisacárido conteniendo una hexosa.

Esta fracción I, fracción protéica, precipita abundantemente con el suero tifoso. El tipo de la precipitación en los dos casos fue el H y no el O, siendo la primera observación del aglutinina de tipo H en sueros tifosos.

Al líquido absolutamente claro que se obtuvo después de la precipitación de la parte protéica se agregó 8 partes de alcohol de 96° con lo que se formó un precipitado blanco muy abundante. Este precipitado era fácilmente soluble en agua destilada, dando aspecto ligeramente lechoso y exhibiendo el fenómeno de Tyndall de las soluciones coloidales. Todavía dió la prueba de Biuret indicando la presencia de proteína. Esta fracción de que hablamos, la número II, precipitó abundantemente con suero antiproteo y con suero tifoso exhibiendo el tipo O del fenómeno. Químicamente consiste casi exclusivamente en un carbo-hidrato que da, al contrario del carbo-hidrato de la fracción I las reacciones de las pentosas y ácidos urónicos florogucina y ozcina. No determinó todavía estas substancias. Para limpiar la fracción II de huellas de substancias protéicas se le trató otra vez con ácido acético diluído y se volvió a precipitar con alcohol varias veces. A medida que se eliminaron las substancias protéicas el carbo-hidrato obtenido era más difícilmente soluble en agua. Se disolvió, empero, bastante bien, en sosa cáustica muy diluída. También la reacción con suero tifoso disminuyó progresivamente con la

eliminación de las sustancias protéicas, mientras la precipitación con suero antiproteo progresó en altísimas diluciones del carbo-hidrato. El carácter de la precipitación era intermedio entre los tipos H y O.

Por estas breves observaciones estoy inclinado a pensar, provisionalmente, que el factor común o parecido entre la *Rickettsia prowazeki* y el bacilo proteo está en alguna forma ligado a la parte protéica del bacilo X 19 y no a la fracción del carbo-hidrato principal del proteo. Esto hablaría en favor de la hipótesis de Felix de que el proteo es un derivado de la rickettsia, porque sabemos que la parte protéica determina la especie, mientras que el factor C el carbo-hidrato, caracteriza al tipo, como por ejemplo en los neumococos que todos tienen la misma albúmina, en tanto que los tipos I, II y III, etc., tienen carbo-hidratos propios y específicos del tipo.

Sin embargo, considero muy necesario repetir y extender el estudio a sustancias químicas mucho más purificadas que las que hemos estudiado hasta hoy. De 100 cajas grandes de cultivo que nos dieron más de 40 c.c. de cuerpos bacilares, solamente obtuvimos en el último ensayo 38 centigramos de carbo-hidrato impuro.

Otro problema al que hemos dirigido nuestra atención es la imposibilidad del cuy para producir aglutininas contra el proteo X 19 en el curso de una infección tífosa, a pesar de que este animal las produce cuando se le inocula con proteos mismos.

Recientemente publicó Durant que ha observado aglutininas en el cuy tífico si la infección se practica intracardiaca. No hemos podido comprobar los resultados de Durant. Nuestros animales no dieron resultado positivo en la reacción de Weil Felix después de inoculación intracardiaca de dosis fuertes de virus. La imposibilidad del cuy para producir aglutininas en el curso de una infección tífosa, mientras las produce por inoculación con el bacilo X 19, habla fuertemente contra la idea de que el aglutinógeno de la rickettsia y el del proteo sean sustancias idénticas. Solamente puede tratarse de sustancias químicamente parecidas, sea por tener radicales semejantes o una constitución estructuralmente parecida de las moléculas de las dos sustancias aglutinógenas.

La imposibilidad del cuy para formar Weil Felix positivo se explicaría fácilmente si se pudiera encontrar en este animal un antígeno hetero-genético que inoculado al conejo engendrara esa reacción positiva, porque sabemos que un animal, en este caso el cuy, no

es capaz de formar anticuerpos contra sustancias que ya contiene su protoplasma.

Hemos empezado ya estas investigaciones también con la colaboración del Dr. Gerardo Varela.

DISCUSION

Dr. Mooser, contestando al Dr. Izquierdo

No mencioné detalles de la determinación de los polisacáridos porque no quise incomodar a los señores Académicos con química orgánica. Que se trata de polisacáridos y no de azúcares, es evidente por la circunstancia de que los productos obtenidos no reducen el licor de Fehling sino después de hidrolizarlos con ácidos minerales diluïdos.

El conocimiento de los polisacáridos específicos lo debemos a Heidelberg y Avery, quienes los aislaron de los diferentes tipos de neumococos. Se trata de polisacáridos de peso atómico muy alto y cada uno es de constitución química diferente. Casi siempre contienen una hexosa acoplada en forma glucosídica al ácido glucorónico, un ácido aldobiónico. Otros contienen azúcares aminados, hexosaminas; otros, pentosas. Estas se determinan por su calidad de transformarse en furfurool bajo la acción de ácidos minerales concentrados. Las hexosas dan oximetilfurfurool, que bajo la acción de ácido caliente se transforma en ácido levulínico, el producto específico de la acción de ácidos minerales fuertes sobre las hexosas.

Un método cualitativo muy elegante para la busca de las pentosas, es el tratamiento de la substancia en cuestión con ácido clorhídrico, orcina y tricloruro de hierro, resultando un producto de color verde. Esta reacción también se debe a la formación de furfurool.

Contestando las otras sugerencias del señor Dr. Izquierdo respecto al problema coloidal de las reacciones serológicas tengo que decir que la química coloidal no es capaz de explicar la **especificidad** de tales reacciones. Solamente el estudio químico por métodos de química orgánica, puede adelantar nuestros conocimientos. Es el gran mérito, sobre todo de Karl Landteiner, haber sacado la serología de la fraseología como **DESEQUILIBRIO COLOIDAL** y del marasmo coloidoclásico para ponerla sobre bases sólidas de química orgánica

estructural. Claro está que los fenómenos de precipitación, floculación, aglutinación, etc., se explican por fenómenos en soluciones coloidales (ni quien lo niegue), pero el hecho de que un suero obre específicamente sobre cierto micro-organismo, solamente puede explicarse por afinidades químicas bien definidas, entre el suero y el antígeno. A este respecto hay una diferencia absolutamente esencial entre la aglutinación de micro-organismos y la precipitación de soluciones de albúmina por ácidos, y la aglutinación y la floculación por sueros específicos, y esta diferencia la llamamos especificidad.

Esta especificidad nos maravilla cada día más.

Landsteiner logró diferenciar por métodos serológicos no solamente cuerpos de constitución química muy parecida, sino también formas isómeras de la misma substancia, como, por ejemplo, el ácido tartárico dextrogiro, del ácido tartárico levogiro y mesogiro, después de acoplarlos con cuerpos protéicos para hacerlos antigénicos.

La química coloidal no es capaz de resolver problemas de estructura íntima de las substancias; por consiguiente tampoco es capaz de hacernos entender el gran enigma de la especificidad de los fenómenos serológicos.

UN CONCEPTO NUEVO EN DERMATOLOGIA.

LAS DERMATOSIS INVISIBLES DE GOUGEROT

Por el Dr. Ricardo E. Cicero.

En la sesión de 9 de noviembre de 1933 de la Sociedad Francesa de Dermatología y Sifilografía el distinguido Profesor de Clínica de esas especialidades en la Facultad de París, Dr. H. Gougerot, hizo considerandos interesantes sobre las **erupciones despigmentantes de pigmentaciones ya existentes** y otros sobre **dermatosis invisibles despigmentantes y leucomelanodermias post-lesionales después de las dermatosis invisibles** (microscópicas, etc.).

En la sesión de 14 de diciembre de la misma Sociedad se ocupó con mucha mayor extensión del asunto en un artículo titulado: