

“LOS VIRUS DE LA FIEBRE AMARILLA”

DR. CARLOS CAMPILLO S.

LOS CONCEPTOS sobre la etiología de la fiebre amarilla eran todavía muy oscuros a fines del siglo pasado, no obstante que el virus causal habría de descubrirse en los primeros años del presente. Sanarelli, 1897¹ obtuvo por hemocultivo, un gérmen al que denominó bacilo icteroides por suponerlo responsable de la enfermedad. Apoyadas más por su prestigio que por otras razones, las ideas de Sanarelli eran acogidas sin entusiasmo por los científicos de la época.

Walter Reed² fué quien las echó definitivamente por tierra, al demostrar que el llamado bacilo icteroides, formaba parte de la flora microbiana del colon de los enfermos estudiados, y que si acaso tenía alguna participación en la etiología de la fiebre amarilla, era sólo a título de invasor secundario.

El año siguiente, 1900, Reed³ al frente de la Comisión de la Fiebre Amarilla del ejército de los Estados Unidos, se trasladó a Cuba donde sus primeras experiencias fueron ampliadas y confirmadas por la Comisión que, además de él, estuvo integrada por los doctores Carroll, Lazear y Agramonte.

La Comisión comenzó por recoger las ideas de Finlay sobre la existencia de un mosquito transmisor, decisión que fué en gran parte influida por las recientes observaciones que en el paludismo habían realizado Ross y los autores italianos. Entre los memorables trabajos que esa célebre Comisión emprendió en el corto lapso de sólo dos años figura, desde el punto de vista que nos ocupa, la experiencia que Reed y Carroll realizaron el 15 de octubre de 1901, consistente en inyectar por vía subcutá-

nea 3 cc. del suero filtrado y diluido de un enfermo experimentalmente infectado con fiebre amarilla, a tres personas receptoras; dos de las cuales presentaron manifestaciones clínicas de la enfermedad. La idea de inocular el suero filtrado estaba inspirada en los trabajos que hacía poco habían emprendido con buen éxito Loeffler y Frosch,⁴ sobre la transmisión experimental de la fiebre aftosa en el ganado.

En vista del resultado obtenido, Reed⁵ concluyó: "estas experiencias parecen indicar que la fiebre amarilla es causada por un microorganismo de tamaño tan pequeño que bien podría llamarse ultramicroscópico". Por primera vez, se demostraba que una enfermedad del hombre, es producida por un virus patógeno. Sin embargo, la prueba no era definitiva y nuevas dificultades habrían de surgir más tarde.

Otra Comisión de la Fiebre Amarilla fué constituida bajo los auspicios de la Fundación Rockefeller, y a poco de iniciar sus trabajos, Noguchi, que era uno de sus miembros, anunció el descubrimiento de su famosa leptospira.⁶ La reconocida autoridad de Noguchi y el hecho de que sus hallazgos en Guayaquil hubiesen sido confirmados después en otros países, como México, Brasil y Perú, fortalecieron el punto de vista de quienes sostenían la participación etiológica de la leptospira, por lo que ésta figuró desde entonces, frente al virus de Reed, como presunta responsable de la enfermedad.

Los estudios que llevó a cabo en Africa occidental, una nueva rama de la Comisión de la Fiebre Amarilla, organizada también por la Fundación Rockefeller, contribuyeron grandemente a resolver el problema. Se empezó por buscar huéspedes experimentales que tanta falta hacían para emprender estudios sistemáticos: habiéndose encontrado que varias especies de monos y en particular el macacus rhesus eran susceptibles a la fiebre amarilla.⁷ Una vez logrado lo anterior, fué posible reproducir la experiencia original de Reed y demostrar sin género de duda, que un agente filtrable podía transmitir la enfermedad en serie en los monos, cuya sangre se convertía en fuente de contaminación para el aedes aegypty, que a su vez, mediante la picadura, podía infectar nuevos monos.⁸

La leptospira icteroides no se encontró en ninguno de los 67 casos que fueron objeto del estudio. Así vino a caerse en la cuenta de que se trataba de dos enfermedades distintas: la fiebre amarilla producida por un virus filtrable y la leptospirosis ictero-hemorrágica, por el germen de Noguchi.

Por el cuadro clínico no podían diferenciarse y dada, en ocasiones, su presencia simultánea en el mismo sujeto, todo concurría a engendrar

un equívoco tanto más lamentable, cuanto que el propio Noguchi había de pagarlo con la vida.

Restaba averiguar las relaciones entre la fiebre amarilla africana y americana. Mediante pruebas de inmunidad cruzada con virus de distinta procedencia, fué posible demostrar en el Laboratorio que la Fundación Rockefeller había establecido en Nueva York, que se trataba de una sola y misma enfermedad.⁹

Finalmente Theiler¹⁰ logró infectar por vía intracerebral al ratón blanco con la cepa Asibi - que había de ser después universalmente famosa-- la cual recibió su nombre del nativo cuyo suero sirvió para inocular al macaco rhesus, en el que se aisló por primera vez.

Si el descubrimiento del agente etiológico de la fiebre amarilla, señaló una fecha histórica en los anales de la Virología humana, las páginas clásicas de esta nueva rama de la Medicina, iban a escribirse a medida que se desarrollaran los estudios de que fué objeto el primer virus patógeno identificado por el hombre.

Intentaré reseñar aquí, esos estudios que son modelo de clasicismo científico y fuente de enseñanza.

La filtración y la ultracentrifugación coinciden en señalar cifras que oscilan entre 12 a 25 milimicras para el diámetro de las partículas del virus, asumiendo que sean éstas esféricas. Por tanto figura entre los virus más pequeños.

Una temperatura de 55° C destruye la mayoría de las cepas en 10 minutos; pero el virus desecado es más resistente a la acción destructora del calor. Así el material liofilizado puede conservarse varios años a la temperatura del refrigerador y las vacunas desecadas retienen su capacidad inmunizante después de haber sido expuestas por varias semanas a la temperatura ambiente de los climas tropicales.

Es necesario recordar que el virus se inactiva rápidamente en medios libres de proteínas lo que se evita añadiéndoles sueros sanguíneos de distinta procedencia. La vacuna preparada con la cepa 17D contenía suero humano que fué definitivamente eliminado de su composición, cuando surgió el problema de las hepatitis post-vacunales, y una vez que se hubo demostrado que el suero y *no* el virus de la fiebre amarilla, era el responsable de esos accidentes. Desde entonces el agua destilada ha substituído al suero humano sin que por ello se haya observado disminución apreciable en la estabilidad y potencia inmunizante de las vacunas. Con el perfeccionamiento de las técnicas de liofilización, la presencia del suero sanguíneo ya no se hizo necesaria.

Desde el punto de vista inmunológico, no hay diferencias entre las cepas del virus según se demuestra por las pruebas específicas. Son éstas, las de neutralización, fijación del complemento, y las más recientes, de inhibición de la hemoaglutinación. Se admite que cada una de ellas descubre anticuerpos distintos. Los que intervienen en la neutralización son más específicos y duraderos, de ahí, la preeminencia de esas pruebas sobre las demás y el uso rutinario que de ellas se hace en las encuestas epidemiológicas. La índole del presente trabajo no permite entrar a describir los detalles técnicos de las pruebas de protección, por lo que sólo serán mencionadas en las líneas subsecuentes. Mediante las pruebas de hemoaglutinación recientemente introducidas por Casals¹¹ se ha demostrado que el virus amarílico cae dentro del grupo de los virus que producen encefalitis transmitidas por artrópodos. Pertenece al subgrupo B de Casals juntamente con los virus del dengue y las encefalitis de San Louis, japonesa, rusa y del Valle Murray; así como los virus llamados Ilheus, Ntaya, Uganda, etc., propios de las regiones tropicales. Con todos ellos guarda relaciones antigénicas muy estrechas.

Los animales que puede infectar el virus amarílico, pertenecen a especies muy distantes entre sí. Además del ratón y del macaco que ya fueron mencionados, casi todos los monos africanos y americanos que han podido estudiarse, son también susceptibles. Es de notarse que, en general, los monos americanos desarrollan la forma fatal de la infección, la que por el contrario, suele ser benigna en los que proceden del Continente Africano.

La inoculación por vía intracerebral de los cobayos produce regularmente una encefalitis fatal; pero la vía parenteral da lugar a respuestas muy variables. En cambio, la rata y el conejo son totalmente refractarios por cualquier vía.

Con el propósito de descubrir los huéspedes de la fiebre amarilla selvática, se han inoculado muchos animales silvestres, habiéndose encontrado que son susceptibles algunos desdentados como los armadillos, perezosos y hormigueros; ciertas variedades de cerdos salvajes y algunos roedores. En la mayoría de ellos, la enfermedad sólo se descubre por la presencia del virus en la sangre.

Por lo que toca a los mosquitos que pueden actuar como vectores, ya sea en la naturaleza o en condiciones experimentales, se ha probado que el virus se multiplica en el interior de sus organismos. El virus se propaga también en el embrión de pollo.

Las infecciones experimentales del macaco rhesus y del ratón mere-

cen estudiarse en detalle, por la valiosa información que proporcionan sobre algunas de las propiedades más importantes del virus, como son las afinidades tisulares que éste exhibe en los distintos huéspedes y su facultad de mutación.

Analicemos primero algunos de los hechos más salientes que tienen lugar cuando el macaco se inocula con un virus amarílico que, por haber sido aislado directamente de un caso humano, recibe el nombre de "natural o no modificado". Llama la atención desde luego, que la infección pueda inducirse prácticamente por todas las vías: intracutánea, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intranasal, intragástrica e intracerebral. Al cabo de dos o tres días de efectuada la inoculación, el virus se encuentra siempre en la sangre a concentraciones elevadísimas, hasta de un billón de partículas infectantes por cc. En seguida y de una manera constante, el hígado va a ser el sitio donde el virus se multiplica con mayor intensidad. Además del hígado, el agente infeccioso invade el sistema linfático, la médula ósea, el bazo, el sistema retículoendotelial en general, el riñón, las cápsulas suprarrenales y otros órganos. Por el contrario, en el cerebro el virus sólo existe en cantidades mínimas o no aparece en absoluto. Las más de las veces, el proceso termina con la muerte que es ocasionada por las lesiones hepáticas. Como puede verse, en el caso que consideramos, el virus amarílico que penetra en el organismo por cualquiera de las vías mencionadas, se disemina por la corriente sanguínea y muestra afinidad por numerosos órganos de la economía, en particular por el hígado. Por todo esto, se dice que es "viscerotrópico" y aún "hepatotrópico"; mientras que el calificativo de "neurotrópo" evidentemente no le conviene, dado que su afinidad por el tejido nervioso es muy pequeña. A este respecto cabe mencionar que aún en el supuesto de que el virus viscerotrópico no se inocule al macacus rhesus por vía intracerebral, la enfermedad va a desarrollarse en la forma descrita, y si el animal muere, lo hará a consecuencia de la necrosis de la glándula hepática; pero sin presentar síntomas de encefalitis. En cambio, ésta última se producirá con carácter mortal en el caso de que el animal haya sido protegido antes de la inoculación con suero inmune, el que por otra parte, evitará la infección sistemática general. Una observación de esta naturaleza sirvió de base a las primeras inmunizaciones que se efectuaron en los seres humanos, mediante el uso combinado de virus neurotrópo —cepa francesa— y suero inmune.¹²

La enfermedad que produce un virus no modificado —cuyo prototipo puede ser la cepa Asibi— en el ratón adulto tiene características muy

diferentes de las que ya fueron señaladas a propósito del macaco. En efecto, la única vía capaz de provocar la infección en el ratón adulto, es la intracerebral u otra, que como la intranasal, brinde fácil acceso a las estructuras nerviosas; el virus se propaga a lo largo de los nervios, no invade la sangre ni las vísceras y produce, en última instancia, una encefalitis fatal. Se comporta en suma, como virus neurotrópico.

Que el sitio de ataque es el encéfalo, bien lo prueba el hecho de que la encefalitis puede desencadenarse por vía intrapritoneal en el ratón adulto, si al mismo tiempo se inyecta almidón u otra sustancia inerte en la cavidad craneal. Puesto que la vía intraperitoneal es por sí misma ineficaz, resulta posible admitir, que el traumatismo intracraneal tiene el efecto de localizar en el encéfalo, las pequeñas cantidades de virus que a partir del sitio de inoculación, se habían liberado a la sangre circulante. Así es como se realiza la prueba de protección de Sawyer y Lloyd.¹³

CUADRO N° 1

Esquema comparativo de la infección experimental producida en el macacus rhesus, ratón adulto y ratón joven, con el virus amarílico "no modificado".

(Pantotropismo)

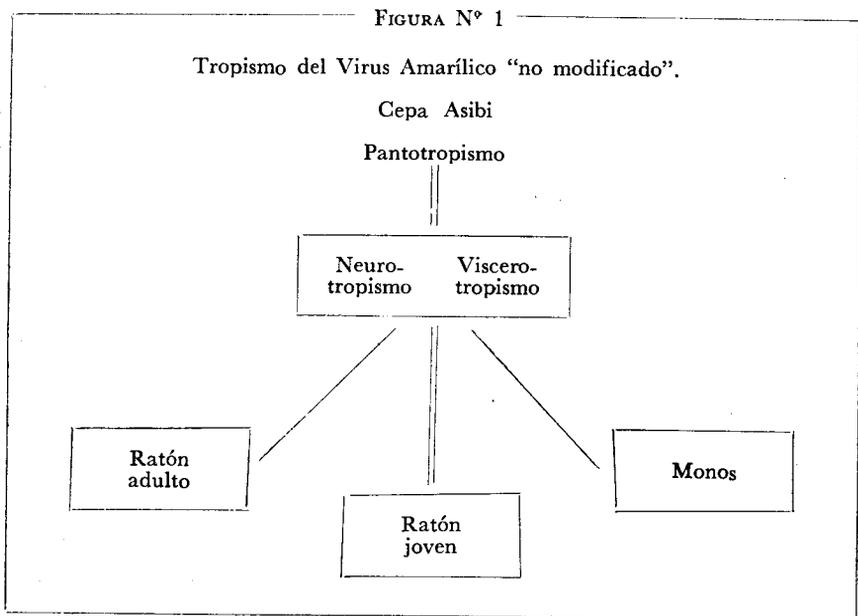
<i>Animal</i>	<i>Susceptibilidad por vía</i>		<i>Vía de propagación en el organismo</i>		<i>Sintomatología específica</i>	
	<i>paren-teral</i>	<i>Intra-cerebral</i>	<i>Sanguínea</i>	<i>Nerviosa</i>	<i>Hepática</i>	<i>Encefálica</i>
Macacus Rhesus	++	+	+	--	+	—
Ratón Adulto	—	+	—	+	—	+
Ratón Joven	+	+	—	+	—	+

Por lo que toca a las afinidades tisulares del virus, la infección del ratón joven ocupa un lugar intermedio entre las dos precedentes. Así lo demuestra el hecho de que el ratón joven se infecta tanto por la vía intracerebral, como por la parenteral. A semejanza de lo que ocurre en el ratón adulto, el virus se propaga por vía nerviosa y el resultado final es también una encefalitis. Es muy interesante el hecho de que con el

progreso de la edad se desarrolla una resistencia gradual a las inoculaciones por las vías subcutánea e intraperitoneal, en forma tal, que entre los 18 y 21 días estos animales reaccionan, parte como los más jóvenes y parte como los adultos. Dada su gran susceptibilidad por vía subcutánea, los ratones cuya edad es inferior a 18 días, son muy adecuados para emprender estudios de transmisión experimental en los que son expuestos a la picadura de mosquitos infectados. Asimismo, las pruebas de neutralización alcanzan en ellos, especial sensibilidad al verificarse la inoculación por las vías indicadas —subcutánea e intraperitoneal— con la ventaja de no requerirse, en tales casos, el traumatismo intracerebral.

Una vez considerada en sus rasgos esenciales la enfermedad de los ratones jóvenes y adultos, conviene investigar que es lo que sucede cuando el virus se propaga en serie, por vía intracerebral en esos roedores.

De lo anteriormente expuesto se deduce, como puede observarse en la figura N° 1, que el virus no modificado es *pantróptico*, puesto que lle-



va en sí mismo la facultad de manifestar dos tendencias principales: la viscerotrópica que despliega en el organismo del macaco y la neurótropa que se exterioriza cuando infecta al ratón adulto. En el ratón joven los dos tropismos existen entremezclados, si bien con predominio del ner-

vioso. Por consiguiente, el tropismo del virus es una facultad condicionada al huésped en que se propaga.

A medida que se realizan los pases sucesivos con las suspensiones infectantes del cerebro, el período de incubación se acorta hasta llegar a un mínimo del cual no se puede pasar. Cuando se ha alcanzado ese período mínimo de incubación, que por lo general es de 5 días, se dice que el virus se ha fijado y entonces, recibe este nombre: "virus fijo". El fenómeno es del todo análogo al que Pasteur estudió magistralmente con el virus de la rabia. Como en éste, tanto la facultad de fijarse, como las modalidades del proceso, son propiedades inherentes a cada una de las cepas del virus del que no cabe decir que se haya "adaptado", ya que el ratón es originalmente susceptible al virus no modificado. Una vez que éste ha exaltado su virulencia a través de los pases intracerebrales, recibe la designación de virus "neurotrópico".

Lo anterior llevaría a pensar que el virus neurotrópico sólo se distingue del original, por la mera exageración de su afinidad por el tejido nervioso. Sin embargo, la inoculación al macaco con el virus neurotrópico, —cuyo prototipo es la cepa francesa aislada originalmente en Dakar— pone de manifiesto que alteraciones más profundas han tenido lugar durante el proceso de fijación en el cerebro del ratón. A diferencia del virus no modificado, el virus neurotrópico inoculado por vía intracerebral provoca encefalitis en el macaco, a pesar de que éste no haya sido protegido con suero inmune; por vía parenteral el virus no alcanza en la sangre concentraciones tan elevadas, y la invasión del hígado es menos constante. Es decir, que el virus que ha sufrido pases sucesivos por el cerebro del ratón es, comparativamente con la cepa natural que le dió origen, menos viscerotrópico para el mono y más neurotrópico. En otras palabras, se ha modificado, experimentalmente una mutación.

Otro hecho que se pone también en claro, es la oposición de los dos tropismos, de manera que al exagerarse uno, el otro se deprime.

Atendiendo a las semejanzas que la enfermedad natural y experimental de mono guarda con la de los seres humanos, era de preverse que los hallazgos anteriores fueran a encontrar aplicación en éstos últimos. Desde entonces, los franceses han usado la cepa neurotrópica aislada en Dakar, para vacunar a los habitantes de sus posesiones africanas. Los resultados han sido excelentes no obstante que el virus neurotrópico francés revela todavía, cierto neurotropismo no exento de riesgos.

Con la mira de obtener cepas más atenuadas, Haagen y Theiler (1932), emprendieron los primeros trabajos sobre la propagación del virus ama-

rílico en cultivo de tejidos. Lloyd, Theiler y Ricci (1936), propagaron la cepa Asibi en tejidos de embrión de ratón a lo largo de una serie de subcultivos que llamaron 17E. La cepa mantenida en esta serie, reveló marcada atenuación de su viscerotropismo; pero los macacos que se inocularon por vía intracerebral con el material procedente del subcultivo número 203, murieron de encefalitis. Con el objeto de atenuar el neurotropismo, el embrión de ratón fué sustituido por el embrión de pollo. Después de haber realizado 18 pases en aquél, 58 más fueron hechos en cultivos preparados por trituración de embriones de pollo enteros. A partir de entonces el virus continuó propagándose, tanto en las suspensiones de todo el embrión de pollo, como en otras provenientes de embriones a los que se les había quitado el cerebro y la médula. Esta segunda serie que se llamó 17D, alcanzó 160 subcultivos. Entre los subcultivos 89 y 114, ocurrió una mutación caracterizada por la pérdida casi completa de la patogenicidad tanto viscerotropa como neurotrópica. La antigenicidad por el contrario, no había sufrido menoscabo, la mutación parecía estar muy firmemente establecida y presentaba además la ventaja de no ser infectante para el *aedes aegypti*. Por tanto, la cepa 17D se consideró que llenaba todos los requisitos para ser empleada en la inmunización de los seres humanos. Soper y Smith (1938) vacunaron con buen éxito el primer grupo de personas en Brasil; en la actualidad el número de vacunados con esta cepa, suma varios millones.

Se desconocen las causas que determinaron la atenuación de la cepa 17D. Los mismos procedimientos fueron aplicados a la cepa neurotrópica francesa con resultados negativos. Aún con la cepa Asibi la repetición fiel de todo el proceso de cultivo no tuvo por consecuencia el que la mutante volviera a surgir. Tampoco las otras líneas de cultivos en embrión de ratón, embrión de pollo entero y testículos de ratón que Theiler y su grupo prosiguieron simultáneamente con la serie 17D, ocasionaron la atenuación definitiva del virus. Ello demuestra que el tejido de embrión de pollo no determinó como tal, la aparición de la mutante.

De gran importancia son los trabajos de Penna y Moussatché (1939) quienes por pases sucesivos de la cepa Asibi en el embrión de pollo, lograron obtener, a su vez, una mutante análoga a la 17D. El hallazgo además de proporcionar el medio donde actualmente se prepara la vacuna en gran escala, contribuyó a demostrar que la ausencia de tejido nervioso en los cultivos de la tantas veces mencionada serie 17D, no fué factor decisivo en la atenuación del virus, ya que éste se multiplica ampliamente en el cerebro del embrión de pollo.

De cualquier manera que sea, la mutante 17D del virus amarílico obtenido por Theiler, ha constituido una vacuna que por su inocuidad y gran eficacia, es de uso universal. Su descubrimiento, corona la obra gigantesca de quienes con visión clara y denonado esfuerzo obtuvieron para la Medicina preventiva uno de los más preciados galardones.

REFERENCIAS

1. *Sanarelli, J.* 1897. "Etiologie et pathogénie de la fièvre jaune". Ann. Inst. Pasteur, 11:433-514.
2. *Reed, W. y Carroll, J.* 1899. "Bacillus icteroides and Bacillus cholerae suis; preliminary Note". Med. News, 74:513-514.
3. *Reed, W., Carroll, J., Agramonte, A. y Lazear, J. W.* 1900. "Etiology of yellow fever preliminary Note. Phila., M. J., 6:790-796.
4. *Loeffler y Frosch.* 1898. "Berichte der Kommission zur Erforschung der Maul- und Klauenseuche bei dem Institut für Infektionskrankheiten in Berlin. Centralbl. Bakt., 23:371-391.
5. *Reed, W., y Carroll, J.* 1902. "Etiology of yellow fever; supplemental Note. Am. Med., 3:301-305.
6. *Noguchi, H.* 1919. "Etiology of yellow fever; transmission experiments on yellow fever". J. Exper. Med., 29:565-584.
7. *Stokes, A., Bauer, J. H., y Hudson, N. P.* 1928. "Transmission of yellow fever to *Macacus rhesus*, preliminary Note". J.A.M.A., 90:253-254.
8. *Stokes, A., Bauer, J. H., y Hudson, N. P.* 1928. "Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals". Am. J. Trop. Med., 8:103-164.
9. *Sawyer, W. A., Kitchen, S. F., Frosbisher, M., Jr., y Lloyd, W.* 1930. "Relationship of yellow fever of Western Hemisphere to that of Africa and to leptospiral jaundice". J. Exper. Med., 51:493-517.
10. *Theiler, M.* 1930. "Suceptibility of white mice to virus of yellow fever". Science, 71:367.
11. *Casals, J.* 1957. "The arthropod-borne group of animal viruses". Trans. N. Y. Acad. of Sci., Ser. II, 19:219-235.
12. *Sawyer, W. A., Kitchen, S. F., y Lloyd, W.* 1931. "Vaccination of humans against yellow fever with immune serum and virus fixed for mice". Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 29:62-64.
13. *Sawyer, W. y Lloyd, W.* 1931. "Use of mice in test of immunity against yellow fever". J. Exper. Med., 54:533-555.
14. *Lloyd, W., Theiler, M., y Ricci, N. I.* 1936. "Modification of virulence of yellow fever virus by cultivation in tissues in vitro". Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 29:481-529.
15. *Soper, F. L., y Smith, H. H.* 1938. "Yellow fever vaccination with cultivated virus and immune and hiperimmune serum". Am. J. Trop. Med., 18:111-134.
16. *Penna, H., y Maussatché, H.* 1939. "Modificao do virus de febre amarella por passagens em serie no embriao de gallinha em desenvolvimento". Brasil-Med., 53:903-904.