Herpes Experimental

por los

Dres. ROMIRIO BIGLIERI y CONRADO VILLEGAS

Las recientes publicaciones de Levaditi y sus colaboradores, han tenido la rara virtud de interesar la atención del mundo científico y de llevar al primer plano cuanto se refiere al herpes experimental. Esta enfermedad, tan frecuente sin embargo, había pasado casi inadvertida y excepto algunas observaciones de Grüter y otra de Kraupa no recordamos sino las sumarias investigaciones de Lowenstein cuyos resultados publicara en 1920. Hoy el cuadro ha variado fundamentalmente, las pequeñas vesículas características no serían otra cosa que la expresión local de una enfermedad general y quizá temible si admitimos la unidad etiológica que proclama Levaditi. Se recuerda a cada instante la afinidad nerviosa del virus, comprobada experimentalmente y se ha exhumado para corroborarlo, las antiguas constataciones de Ravant en el líquido céfalorraquídeo de los herpéticos.

Las investigaciones parciales proseguidas en Norte América y especialmente en Europa por numerosos autores, han contribuído para que el conocimiento del herpes esté al mismo nivel que el de otras enfermedades infecciosas graves.

Resumimos así las comprobaciones que ya no se discuten.

1º Todas las formas de herpes, espontáneo humano (excepto el zoster) tienen un mismo agente etiológico.

2º La inoculación del contenido vesicular herpético provoca en el conejo una querato conjuntivitis típica transmisible en serie. (Grüter-Kraupa-Lowenstein).

3º Por vía endovenosa (Luger y Lauda) o subdural (Blanc) engendra un síndroma característico de origen nervioso central transmisible en serie por cualquiera de las dos vías. El mismo síndroma sigue a veces a la inoculación corneal.

4° La substancia nerviosa de los animales que lo padecen determinan en inoculación corneal, la querato conjuntivitis herpética.

5° El germen del herpes, es un virus filtrable (Lowenstein, Luger y Lauda, etc.).

6° Algunos medios físicos o químicos, (temperatura, desecación glicerina, substancias colorantes), y mecánico (dilución) actúan sobre él como sobre otros ultravirus (rabia, etc.).

7° Los animales curados de querato conjuntivitis no reaccionan por una nueva inoculación en la misma córnea (Lowenstein), en la córnea opuesta (Doerr) o en el cerebro (Blanc y Caminopetros).

Todas estas conclusiones han sido controladas en primer lugar por las inoculaciones y luego por la Anatomía patológica que hemos omitido por que no está vinculada con nuestro trabajo.

Aquí en nuestro país, a pesar de la trascendencia de los conceptos de Levaditi, tanto mayor desde que fuera señalada la existencia de la encefalitis letárgica, se ha hecho poco para caracterizar la cepa indígena de virus herpético.

Nuestras primeras tentativas de inoculación fueron seguidas de fracasos. Habíamos extraído material de tres pacientes en el período de exulceración y atribuímos el resultado a desaparición precoz del virus.

Nuestra duda se ha vigorizado después porque con facilidad hemos logrado transmitir la enfermedad, recogiendo semilla de un enfermo con vesículas que nos remitió el Dr. Puente de su clínica particular.

Parte del líquido abundante, fué previa escarificación, depositado en la córnea de varios conejos y el resto inyectado por vía subdural a otros. En los conejos de la primera serie aparecieron ya al cabo de 48 horas, pequeñas pápulas redondeadas y planas a lo largo de las estrías. La evolución de estas lesiones fué semejante a las del herpes espontáneo: transformación en vesículas que en muy corto tiempo se ulceraban. De aquí proviene nuestro virus de pasaje corneal y cerebral, porque el cerebro de los animales de la segunda serie que murieron entre el 7° y 14° día no era virulento.

Actualmente nuestros virus deben ser considerados fijos. Inoculados en la córnea, hay reacción evidente en las primeras 24 horas, y la regresión comienza al 5° o 6° día. La inyección subdural despierta un proceso infeccioso del 4° al 6° día, siempre mortal pocas horas después. Relataremos nuestros resultados en varios capítulos y en el orden que sigue. 1° Vías de inoculación. 2° Transmisión en serie. 3° Incubación. 4° Sintomatología y lesiones macroscópicas. 5° Algunas propiedades biológicas de los virus. 6° Inmunidad.

Hemos realizado dos series paralelas de experiencias. Una con el virus de pasaje corneal y la otra con el virus de pasaje cerebral, porque este *inyectado en la córnea jamás reproduce la querato conjuntivitis herpética,* lo que nos indujo a pensar que pudiera tratarse de virus de calidades diferentes o quizá asociados.

Capítulo I. — *Vía de inoculación.* A). *Virus corneal.* Su inoculación en la córnea del conejo provoca siempre, si es previamente escarificada, y algunas veces cuando está intacta, la querato conjuntivitis típica a que nos hemos referido; las lesiones son tanto más precoces cuanto las efracciones son más profundas. El éxito es seguro en los pasajes sucesivos si la semilla es recogida del segundo al quinto día. Ya al sexto, la lesión retrocede y la virulencia del raspado córneo se atenúa. En los días siguientes el resultado es incierto aun recurriendo a escarificaciones profundas.

La vía cerebral es tan segura como la ocular. Los gérmenes banales que en escaso número vegetan en el pus herpético, no modifican el síndroma nervioso, por cuya causa puede inyectarse la emulsión del raspado córneo sin centrifugación previa.

B). *Virus cerebral.* Inoculado en la córnea con la misma técnica que el anterior; *no engendra ninguna lesión visible, ni inmunidad contra el virus córneo.*

Introducido directamente en el cerebro da origen al síndroma que describiremos más adelante, de evolución constantemente mortal en breve tiempo. Como para el virus rábico, la dosis que ha de inyectarse no tiene mayor importancia, basta una gota de emulsión centesimal.

La cámara anterior del ojo ensayada por Lowenstein, es menos segura que la vía cerebral. Algunas comprobaciones negativas de la virulencia del sistema nervioso del animal, probado por aquella vía, hacen que dudemos de su eficacia.

El testículo es un excelente tejido para la conservación del virus en vivo, por lo menos durante 4 días. Si al cabo de este tiempo extirpamos y emulsionamos el órgano inyectado, constatamos la integridad de las cualidades del virus, pero nuestras experiencias poco numerosas, no nos permiten dilucidar si se trata de cultura verdadera o de simple supervivencia.

El intento de infección por la piel sirviéndonos de la técnica de Calmette, Guérin, Camus, ha terminado siempre en fracasos, aunque la observación se prosiguiera hasta el vigésimo día. Estos resultados nuestros están en contradicción con los de Levaditi y colaboradores.

Capítulo II. — *Transmisión en serie.* A). *Virus corneal.* Su

virulencia inicial para la córnea se mantiene intacta después de los numerosos pasajes a que la hemos sometida, como afirma Lowenstein en su primer memoria. La técnica simple, consiste en recoger la semilla por curetaje superficial de la córnea enferma, del segundo al quinto día del proceso y depositarla en igual tejido previamente escarificado de los animales nuevos. El éxito sigue siempre a esta operación y los resultados son evidentes al cabo de 24 horas. La incertidumbre de que la glicerina permita conservar este virus no nos ha permitido interrumpir el pasaje directo de conejo a conejo.

Doerr señaló que los animales inoculados por esta vía, morían frecuentemente a consecuencia de la generalización del proceso. Hemos constatado que efectivamente el porcentaje de conejos afectados de querato conjuntivitis herpética que mueren entre el 14° y 20° día siguiente a la inoculación, es alto (40 a 50 %) pero excepto un conejo que presentó el síndroma nervioso característico, la virulencia de cuyo cerebro no pudo ser estudiada, los demás cuando han sido observados (porque el proceso suele ser breve y pasar inadvertido a la observación discontínua), en su breve agonía no ofrecen sino una paresia total, que se acentúa paulatinamente. La virulencia del cerebro de 12 de estos conejos fué estudiada por nosotros y *hallada negativa*. Este resultado es opuesto al obtenido por Doerr primeramente y aceptado por la mayoría de autores y quizá sea debido a características de cepas que reclaman su estudio completo.

Los resultados de la inoculación cerebral en serie serán relatados en el subcapítulo que sigue.

B). *Virus cerebral*. Como dijimos ya, el virus corneal del primer pasaje nos ha servido para obtener nuestro virus fijo actual.

Los pasajes sucesivos han determinado como Blanc lo notara, un acortamiento sensible de la incubación que de 7 a 12 días en su comienzo es actualmente de 5 a 6.

Simultáneamente ha desaparecido la variabilidad en la aparición de los primeros síntomas y en su desenlace que solía notarse en los animales de cada lote.

Capítulo III. — *Incubación*. A). *Virus corneal*. En los animales inoculados en la córnea las lesiones locales son visibles al cabo de 24 horas. Suele haber pequeñas diferencias que dependen de la profundidad de las escarificaciones y quizá de la época de recolección de la semilla; si después del 5° día la evolución es más lenta. Es probable que esta modificación sea consecuencia del empobrecimiento en virus de las lesiones en el último término de su evolución y que precedan a su aniquilamiento, como constatamos en los casos de herpes exulcerado a que nos referimos al principio.

Las modificaciones generales que preceden y que determinan la muerte de estos animales no han sido estudiadas, porque no podemos con fundamento juzgarlas como consecuencia de la inoculación corneal.

B). *Virus cerebral*. Su inoculación en la córnea no provoca lesiones ni es seguida de inmunidad siquiera local.

Inyectado bajo la dura madre o en el cerebro, determina 4 a 6 días después un síndroma típico, de origen nervioso central, con virulencia de todo este sistema.

Durante su incubación se producen alteraciones sensibles de la temperatura y del tenor leucocitario de la sangre.

La elevación térmica es la regla. Apenas notables en las primeras 24 horas, alcanza su maximum al 2° día. No son raras las temperaturas que exceden 42 grados centígrados y en uno de nuestros conejos se elevó a 43 grados centígrados. En los días siguientes remite de 1 a 1 ½grado, manteniéndose la temperatura entre 40 y 41 grados hasta pocas horas antes de los primeros síntomas en que sufre una nueva exacerbación. La hipertemia se sostiene hasta la muerte.

La curva del tenor leucocitario de la sangre sigue una marcha paralela a la térmica en los primeros días, separándose de ella en las últimas 24 horas de la incubación.

Se constata al día siguiente de la incubación, un descenso marcado del número de leucocitos, substituída al 2° día por hiperleucocitosis, constante y durable hasta la víspera de la enfermedad; en este momento se advierte el mínimo de glóbulos blancos que oscila del 50 a 60 % de la cifra normal.

Capítulo IV. — *Sintomatología*. A). *Local*. Los rastros de escarificaciones superficiales simples son apenas visibles al cabo de 24 horas y desaparecen antes de las 48 horas. Cuando en ellas se deposita virus herpético, pequeñas pápulas semejando sartas de cuentas son visibles después del primer día. Es probable que sean verdaderas colonias de virus en la córnea y como tales se inician por zonas puntiformes. En el curso del 2° y 3° día adquieren su mayor diámetro (2 a 3 mm.) se vesiculan y ulceran. La forma redondeada de las primeras horas, se conserva hasta que confluyen, en cuyo caso se diseña el característico contorno policíclico.

Junto a las lesiones córneas características del proceso, se desarrolla primero congestión y luego un exudado purulento abundante de la conjuntiva que adhiere los párpados y los dilata en bolsa, completando el síndroma que con todo acierto se designa querato conjuntivitis herpética.

Las lesiones curan siempre dejando tras de sí pannus y opacidad de la córnea no siempre persistente, pues hemos podido comprobar en varios animales la reaparición de la transparencia normal.

La precocidad de los síntomas y su intensidad sobre todo, guardan relación con la profundidad de las escarificaciones y con la época de recolección del gérmen.

B). *General.* Aparece fatalmente en los animales inoculados por vía subdural, no así en aquellos inyectados en la córnea, de los cuales uno solo nos ha parecido atacado.

El primer síntoma de observación directa sobreviene al 3º o 4º día bajo la forma de débil paresia del tren posterior que gana paulatinamente y en pocas horas las partes anteriores, lo cual no impide a los animales mantenerse en pie.

En las pocas horas que median hasta la muerte, los conejos inoculados sufren crisis de salivación abundante, rechinamiento prolongado de dientes, precursores inmediatos de los fenómenos nerviosos que describimos enseguida. El animal se inmoviliza con el sistema muscular en tensión aparente, adoptando una actitud de acecho o de defensa, luego sentado comienza a erguir lentamente la cabeza hasta que su gran diámetro forma una sola recta con las patas anteriores. El movimiento de ascenso avanza, se propaga al tronco y el animal parado solamente en sus patas traseras, en situación vertical parece a punto de caer, extremo a que no llega sino por excepción.

A este período cumplido "in situ" sigue otro ambulatorio. Marchan describiendo grandes círculos hacia uno u otro lado, generalmente siempre el mismo para cada animal y arremetiendo los objetos que hallan en su camino cual si no vieran ni sintieran. En este estado la sensibilidad general y especial parece atenuada.

La pérdida de fuerzas que sucede a estas crisis, se acentúa y después de varias, los animales caen de costado y definitivamente hasta que la muerte los sorprende como última etapa de su debilitamiento progresivo.

CAPÍTULO V. — *Algunas propiedades biológicas de los virus. Efecto de la dilución.* A). *Virus corneal.* Cuando se diluye el producto del raspado córneo en cantidad aproximada de 1 centígr. en 1 o 2 c.c. de solución fisiológica pierde su virulencia para la córnea. Su inoculación no va seguida de lesiones ni de inmunidad.

La vía endocraneana es utilizable aún cuando se vehiculice en 10 c.c., sin disminución sensible de la virulencia.

B). *Virus cerebral.* Muy denso, de mayor virulencia o distribuído de manera más homogénea, lo cierto es que este virus a dife-

rencia del anterior, se comporta a semejanza del virus rábico. Sus diluciones hasta 1 por 1000 actúan con la misma eficacia de las emulsiones concentradas; más allá de este límite y hasta 1|10.000 notamos ligera prolongación de la incubación. Esta propiedad ha permitido alguna vez su depuración mecánica.

b). *Acción de la temperatura*. En el virus corneal no la hemos estudiado porque la dilución por si sola destruye su virulencia.

El virus cerebral, sometido durante 15 minutos a 55 grados pierde su capacidad infectante, aun en emulsión espesa.

A la temperatura ambiente, aún en glicerina, no la conserva más allá de 8 días, hallazgo que podría explicar más de una contradicción experimental.

Su termolabilidad es semejante a la de otros ultravirus cuya afinidad señala Levaditi.

c). *Acción de la filtración*. Las emulsiones cerebrales filtran con dificultad.

El filtrado conserva su virulencia pero sólo parcialmente; mata algunos animales de cada lote, con prolongación evidente de su incubación, diminución pasajera de virulencia que desaparece en el pasaje siguiente.

Hemos usado exclusivamente bujías de Berkefeld, y controlado siempre la esterilidad del filtrado.

D). *Estadía en glicerina*. — a). *Virus corneal*. En la única experiencia realizada, un ojo conservado en la heladera había perdido su virulencia al cabo de 20 días.

C). *Virus cerebral*. A baja temperatura, es un buen conserdor de este virus.

Hemos probado su virulencia sistemáticamente desde 8 días hasta 1 mes sin hallar ninguna diminución.

D). *Cultivos*. No desarrolla en los medios usuales aerobios o anaerobios.

Capítulo VI. — *Inmunidad*. Hemos referido al pasar la consecuencia siempre letal de la inoculación endocraneana, que nos impide apreciar las modificaciones lejanas de los organismos infectados por esa vía.

La infección por la córnea nos suministra un alto porcentaje de animales curados, de cuya inmunidad adquirida informan los protocolos que transcribimos.

A). *Inmunidad de la córnea curada*. Conejo 844 y 884 inoculados en la córnea el 25 de noviembre de 1922, con virus de pasaje reacciona por querato conjuntivitis típica, que cura en 8 días. Reinoculado el 29 de diciembre de 1922 permanece indemne. Dos conejos inoculados para control reaccionan positivamente.

B). *Inmunidad de la córnea opuesta*. Conejo 884. Hemos hecho referencia a él en el subcapítulo anterior. Sufre dos inoculaciones en la misma córnea el 25 de noviembre y el 29 de diciembre de 1922, la primera de la cual solamente fué positiva. El 8 de enero del corriente año fué inoculado en la córnea opuesta apareciendo las primeras lesiones, evidentemente retardadas, al 6º día.

Conejo 924. Inoculado el 8 de enero de 1923. Se le extrae el ojo enfermo 2 días después. Reinoculado en la córnea opuesta el 16 de enero se conduce como los controles. Las condiciones de esta experiencia son desfavorable al establecimiento de la inmunidad. La extirpación del órgano afectado y más aún el intervalo sumamente breve entre ambas inoculaciones explican este fracaso.

C). *Inmunidad del cerebro*. Conejo 844, que nos sirviera para el estudio de la inmunidad corneal.

Se reinocula el 8 de Enero de 1923, por vía endocraneana con virus fijo de pasaje y sobrevive. Dos conejos de control mueren al 5º día.

Concluímos afirmando que la curación del proceso corneal unilateral, inmuniza la córnea en que se desenvuelve y el cerebro y confiere una resistencia relativa a la córnea opuesta.

Fin del Volúmen III