

Contribución al estudio de la Reacción de Widal

Por el Dr. ERNESTO CERVERA

HE querido escoger para mi trabajo reglamentario algún asunto de Bacteriología que tuviese aplicación a la Clínica y que yo hubiese tenido oportunidad de estudiar en mi Laboratorio.

El año pasado aislé por hemocultivo una muestra de bacilos de Eberth y traté de averiguar si estos bacilos aislados en México, podían substituirse con ventaja en la reacción de Widal a la muestra de bacilos tíficos que traje del Instituto Pasteur, de París, y que hasta entonces había estado usando cada vez que se me pedía una reacción de esas. En teoría podía pensarse que las bacterias de la misma localidad fueran más aglutinables que las extranjeras y que usándolas podía llegarse a mayor precisión en el diagnóstico de nuestros casos de fiebre tifoidea.

Se me envió para analizar la sangre de un enfermo que estaba en la segunda semana de fiebre tifoidea y practiqué la reacción de Widal siguiendo el método macroscópico de la Universidad de Oxford, empleando simultáneamente el cultivo de bacilos tíficos del Instituto Pasteur, de París y el de los gérmenes que yo había aislado. El resultado fué que el cultivo europeo fué aglutinado al 1 x 50 y el del país no fué aglutinado ni al 1 x 25. Sin embargo, se trataba de verdaderos bacilos tíficos como lo demuestran sus caracteres bacterioscópicos, las propiedades de su cultivo y sus reacciones inmuno-lógicas.

En efecto, son bacilos cortos, de extremidades redondeadas, muy móviles, no toman el Gram, su cultivo en caldo es turbio, forma ondas *moirés* por agitación y no tiene velo, su cultivo en caldo lactosado carbonatado no desprende burbujas gaseosas, la leche no es coagulada, no produce indol, no reduce el rojo neutro, y sus colonias sobre medios de Endo y de Mac Conkey son incoloras. Para tener el diagnóstico final inmunizamos tres conejos: uno con el tífico del Instituto Pasteur, otro con el germen de que hemos hablado, y el tercero con otro germen que posteriormente aislamos por hemocultivo y que tenía los atributos de un bacilo tífico. Para esto preparamos cultivos de 24 horas en agar, los emulsionamos en suero artificial al 8 x 1000, esterilizamos calentando 1 hora a 60 grados C. en baño maría, ajustamos las suspensiones bacterianas de tal manera que tuvieran 500.000.000 de bacterias muertas por cc., repartimos en ampollitas de 1c.c. sin agregar ningún antiséptico y calentamos las ampollitas cerradas otra hora en baño maría a 60 grados centígrado.

Todas las inyecciones se pusieron en la vena marginal de la oreja y los intervalos fueron de ocho días. La primera inyección fué de 0.25 c.c., la segunda de 0.50 c.c., la tercera de 0.75 c.c., y la cuarta de 1 c.c. Dos de los animales soportaron muy bien las inyecciones y el otro enflaqueció ligeramente. Una semana después de la última inyección se recogieron 5 c.c. de sangre de la vena marginal de la oreja de cada animal, se separó el suero al día siguiente y se procedió a hacer la aglutinación macroscópica, conforme se especifica en los cuadros siguientes:

CUADRO N^o. 1

Prueba de aglutinación con el suero que se obtuvo inyectando al conejo bacilos tíficos del Instituto Pasteur.

Número de tubos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	CANTIDADES EXPRESADAS EN GOTAS.															Testigos		
Diluciones del suero: 1 x 40.....	1					1					1							
1 x 50.....		1					1					1						
1 x 60.....			1					1					1					
1 x 70.....				1					1					1				
1 x 80.....					1					1					1			
Solución salina al 8 x 100.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10
Cultivos de 24 horas en caldo, de bacilos tíficos del Instituto Pasteur.	15	15	15	15	15											15		
Primera muestra en estudio.						15	15	15	15	15							15	
Segunda muestra en estudio.																		15
Proporción en que queda diluido el suero... ..	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 2000	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 2000	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 2000			
Se agitaron los tubos y se pusieron en baño de maría a 55 grados C., haciéndose la lectura cada 30 minutos.																		
Resultado ⁽¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

(1) El signo + indica que la aglutinación se efectuó en 30 minutos; el signo — quiere decir que no hubo aglutinación; un *, que ésta se efectuó en 2 horas.

CUADRO N^o. 2

Prueba de aglutinación con el suero que se obtuvo inyectando al conejo la primera muestra de bacilos en estudio.

Número de tubos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	CANTIDADES EXPRESADAS EN GOTAS.															Testigos		
Diluciones del suero 1 x 40.	1					1					1							
1 x 50.		1					1					1						
1 x 60.			1					1					1					
1 x 70.				1					1					1				
1 x 80.					1					1					1			
Solución salina al 8 x 100.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10
Cultivos de 24 horas en caldo, de bacilos típicos del Instituto Pasteur.	15	15	15	15	15											15		
Primera muestra en estudio.						15	15	15	15	15							15	
Segunda muestra en estudio.											15	15	15	15	15			15
Proporción en que queda diluido el suero.	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 2000	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 1200	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 1200			
Se agitaron los tubos y se pusieron en baño de maría a 55 grados C., haciéndose la lectura cada 30 minutos.																		
Resultado.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	-	-

En resumen, vemos que se hicieron diluciones de cada suero experimental al 1 x 40, 1 x 50, 1 x 60, 1 x 70 y 1 x 80 y se puso una gota de cada una de dichas diluciones en un tubo de hemolisis; luego se añadieron 9 gotas de suero artificial y 15 gotas de cultivo de 24 horas en caldo, para hacer un volúmen total de 25 gotas por tubo. De esta manera las diluciones finales quedaron al 1 x 1000, al 1 x 1250, al 1 x 1500, al 1 x 1750, y al 1 x 2000, respectivamente, y como eran tres cultivos los que había que ensayar, con cada suero, hubo necesidad de disponer 15 tubos, 5 para cada cultivo o sea 1 para cada dilución. Además se dispusieron tres tubos testigos, 1 para cada cultivo, que no llevaron suero aglutinante y que tenían por objeto de-

CUADRO N^o. 3

Prueba de aglutinación con el suero que se obtuvo inyectando al conejo la segunda nuestra de bacilos en estudio.

Número de tubos.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	CANTIDADES EXPRESADAS EN GOTAS.																Testigos	
Diluciones del suero																		
1 x 40.	1					1					1							
1 x 50.		1					1					1						
1 x 60.			1					1					1					
1 x 70.				1					1					1				
1 x 80.					1					1					1			
Solución salina al																		
8 x 100.	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	10	10	10
Cultivos de 24 horas en caldo, de bacilos tíficos del Instituto Pasteur.	15	15	15	15	15											15		
Primera muestra en estudio.						15	15	15	15	15							15	
Segunda muestra en estudio.											15							15
Proporción en que queda diluido el suero.	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 2000	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 1200	1 x 1000	1 x 1250	1 x 1500	1 x 1750	1 x 1200			15
Se agitaron los tubos y se pusieron en baño de maría a 55 grados C. haciéndose la lectura cada 30 minutos.																		
Resultado.	+	+	+	*	*	+	+	+	*	-	+	+	+	*	-	-	-	-

mostrar que los cultivos no se aglutinaban espontáneamente. El resultado fué que cada antisuero aglutinó las tres muestras y cada muestra fué aglutinada por los tres antisueros; pero hubo diferencia en cuanto al grado de aglutinación, pues mientras que el bacilio extranjero fué aglutinado por los tres sueros experimentales en dilución al 1 x 2000, los bacilos en estudio sólo fueron aglutinados en esta dilución tan grande por los sueros experimentales: el preparado con el tífico del Instituto Pasteur y el que se obtuvo con la primera muestra que estábamos estudiando, siendo aglutinados por el otro suero solamente en dilución al 1 x 1750. Entre las dos muestras en estudio, que como acabamos de decir, solo fueron aglutinadas al 1 x 2000 por dos

CUADRO N^o. 4

Reacción de fijación del complemento con los tres sueros experimentales y los los tres antígenos.

Número de tubos.....	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Cantidades expresadas en centímetros cúbicos.															
Solución salina a al 8 x 100	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	2.8	3.	3.	3.	3.	3.	3.
Bacilos tíficos del Instituto Pasteur de París.....	0.2	0.2	0.2							0.2					
Primera muestra en estudio.....				0.2	0.2	0.2					0.2				
Segunda muestra en estudio							0.2	0.2	0.2			0.2			
Complemento diluido al 1 x 10....	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Suero experimental obtenido con bacilos tíficos del Instituto Pasteur de París.....	0.2			0.2			0.2						0.2		
Suero experimental obtenido con la primera muestra en estudio		0.2			0.2			0.2						0.2	
Suero experimental obtenido con la segunda muestra en estudio			0.2			0.2			0.2						0.2
Se agitaron los tubos y se pusieron en baño de maría a 37 grados C. una hora.															
Amboceptor diluido al 1 x 250....	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
Suspensión de glóbulos de carnero al 5 x 100.....	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.	1.
Se agitaron los tubos nuevamente y se pusieron en baño de maría a 37 grados C., 30 minutos despues de lo cual se apreció el resultado.															
Resultado (1).....	-	-	-	-		-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

-(1) El signo + indica la hemolisis total; el signo — indica que ésta no se hizo.

sueros únicamente, también hubo alguna diferencia, pues mientras que la segunda fué aglutinada por ambos sueros en media hora, la primera solo fué aglutinada por un suero en media hora y por el otro en dos horas.

Ocho días después de la primera sangría, se practicó otra con el objeto de estudiar la fijación del complemento. Se le tomaron a cada conejo 5 c.c. de sangre de la vena marginal de la oreja; al día siguiente se separó el suero y se calentó media hora en baño maría a 55 grados C., con el objeto de destruir su complemento natural (Inactivación). Se preparó el antígeno emulsionado una asa de cultivo de 24 horas en gelosa, de cada germen, en 2 c.c. de solución sa-

linas fisiológica esterilizada. Se hizo de dosificación y se tomó la mitad de la dosis anti-complementaria, es decir, 0.2 c.c. Luego se hizo la dosificación del emboceptor hemolítico anti carnero y del suero de cuy diluido al décimo, que iba a servir de complemento, y se tomaron dos unidades de cada uno de estos elementos para hacer la reacción que se dispuso conforme al cuadro adjunto (Núm. 4) y en el cual se ve que cada antígeno fijó el complemento con todos los antisueros y cada antisuero fijó el complemento con todos los antígenos.

RESUMEN Y DISCUSION.—Se aislaron por hemocultivo dos gérmenes que por su aspecto microscópico, los caracteres de sus cultivos, sus reacciones bio-químicas, la prueba de aglutinación y la reacción de fijación del complemento, puede afirmarse que son bacilos tíficos. Comparados sus cultivos desde el punto de vista de su aglutinabilidad, con un cultivo procedente del Instituto Pasteur, de Paris, se vió que eran menos aglutinables, aunque ya tenían algún tiempo de vivir en el Laboratorio. Así se explicaría que cuando se práctico la reacción de Widal simultáneamente con el cultivo del Instituto Pasteur y la primera muestra aislada por nosotros, la sangre del paciente que estaba en la segunda semana de su fiebre tifoidea, solo aglutinó el cultivo extranjero. El germen aislado por nosotros era efectivamente un bacilo tífico; pero siendo poco aglutinable, sólo tenían acción sobre él los sueros experimentales mucho más ricos en aglutininas que el suero del enfermo de fiebre tifoidea.

Esta noción, por otra parte, es clásica: se sabe que pueden existir bacilos tíficos auténticos no aglutinables por el suero tifoideo, y es bien conocido que los bacilos de Eberth recientemente aislados del organismo, no adquieren muchas veces la propiedad de ser aglutinados, sino después de haberlos cultivado frecuentemente en caldo.

Es interesante saber que existen estas muestras poco o nada aglutinables para desecharlas cuando se quiere hacer una sero-aglutinación y para no dejar de reconocer algunos bacilos tíficos que tienen todos los otros atributos de la especie.

CONCLUSIONES.—Primera: Para hacer la reacción de Widal deberá escogerse un cultivo bastante aglutinable, poco importa que sea del país o extranjero. Segunda. la aglutinabilidad de un cultivo que se destina a la reacción de Widal, debe aquilatarse con el suero de los enfermos de fiebre tifoidea y no con los sueros experimentales.

México, 10 de marzo de 1920.