

UNIVERSIDAD FEMENINA DE MEXICO
INCORPORADA A LA U. N. A. DE M.

LEPROMINA

T E S I S .

QUE PARA SU EXAMEN PROFESIONAL DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
PRESENTA

ANGELA GODINEZ NORIEGA



MEXICO, D. F.

QUIMICA

1 9 5 0



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A la sagrada memoria de mi Padre

*A mi dulce Madrecita
con veneración y gratitud*

*A mis Hermanos
cariñosamente*

A mis compañeros de estudios

*A mis amigos
Sinceramente*

A mis Maestros
Como un testimonio de cariño y gratitud

Al Maestro

Dr. Dn. FERNANDO LATAPI

De quien siempre recibí estímulo, ayuda y dirección para llevar a cabo el presente trabajo.

*A la Asociación Mexicana de Acción Contra
la Lepra con reconocida gratitud.*

- 1.—Introducción.
- 2.—Comparación de distintas técnicas de
preparación del antígeno.
- 3.—Experiencia Personal.
- 4.—Discusión.
- 5.—Conclusiones.
- 6.—Bibliografía.

INTRODUCCION

La lepromina es un antígeno que se prepara directamente de los nódulos extirpados del enfermo de lepra.

Con este antígeno se lleva a cabo una cuti-reacción semejante a la que se hace con la tuberculina, a fin de pronosticar la benignidad o malignidad del tipo clínico de la enfermedad, que, aunado a otras pruebas del laboratorio, contribuye al auxilio de la exploración diagnóstica.

Tal cuti-reacción recibe el nombre de reacción de Mitsuda y es complementada por otras pruebas como son: baciloscopia, reacción de Wasserman, reacción de Kahn, velocidad de sedimentación, estudio anatomopatológico; además, en el tipo benigno se investiga el trastorno de la sensibilidad con la prueba de la histamina.

La lepra es una enfermedad infecto-contagiosa caracterizada por su curso crónico que se considera como una granulomatosis infecciosa.

Es innegable la importancia de la determinación del tipo de lepra por diagnosticar; pues a pesar del carácter proteiforme del referido padecimiento, se le logra clasificar en tres formas: dos polares, que se consideran como fundamentales y son la Lepra Lepromatosa o maligna y la Lepra Tuberculoide o benigna; y una forma no polar Incaracterística o enmascarada.

Respecto a los tres tipos de lepra, se llega a la conclusión de que los enfermos del tipo lepromatoso son anérgicos a la reacción de Mitsuda; generalmente, los enfermos del tipo tuberculoide, salvo ligeras excepciones, presentan reacción positiva a la reacción de Mitsuda y los pacientes de lepra Incaracterística o Enmascarada en ocasiones presentan reacción positiva y en otras negativa.

Resulta de gran trascendencia compaginar la juiciosa opinión del Clínico Especialista con las pruebas de laboratorio, como también es



manifiesta la gran responsabilidad que atañe al Inmunólogo, encargado de proporcionar al médico, un antígeno de máximas cualidades, para cuya elaboración se haya tomado en cuenta no solo los factores inherentes a la lepromina, sino los relativos al organismo, tales como el sitio de inoculación, el poder inmunogénico o resistencia del individuo y las condiciones normales o patológicas de la piel.

Debe incrementarse el estudio de la lepromina para proporcionar no solo al médico especialista, sino al médico general, un antígeno específico, que sirva para diferenciar cuándo se trata de un enfermo de otra naturaleza y cuándo de lepra, haciendo de la reacción pronóstica de Mitsuda una prueba diagnóstica.

De la determinación del tipo de lepra dependen los puntos de vista: clínico, histopatológico, bacteriológico, inmunológico y social, factores que orientarán las normas profilácticas, epidemiológicas, pronósticas y terapéuticas del padecimiento.

Las cuti-reacciones van a la cabeza de los métodos de diagnóstico; sus resultados permiten completar al médico su juicio clínico.

Las reacciones de Mitsuda y Mantoux son cuti-reacciones muy semejantes. En cuanto a la naturaleza immuno-alérgica, ambas se identifican en el Fenómeno de Koch. Este es un choque protéinico, desencadenado después de la primera fase, es lo que conocemos con el nombre de resistencia a la sobre infección.

En este fenómeno, lo mismo que en otros de inmunidad, intervienen anticuerpos y antígenos.

La concepción de Aschoff reúne la función anticuerpogénica en el Sistema Reticulo Endotelial, el cual es estimulado por la naturaleza del antígeno introducido.

Según las cualidades del antígeno, ocasiona la formación de tres órdenes de anticuerpos específicos: de primero, de segundo y de tercer orden.

El Mitsuda como cuti-reacción que es, pone de manifiesto el movimiento entre el antígeno y los anticuerpos.

Generalizando se establece la existencia de varios tipos de antígenos para aplicarse por vía intradérmica, confines pronósticos para la lepra:

- 1.—Lepromina Integral.—Constituida por una suspensión salina de la papilla, obtenida por ebullición y trituración del leproma íntegro.
- 2.—Lepromina Bacilar.—Que es una suspensión salina de bacilos.
- 3.—Lepromina Salina Purificada.—Formada por el "principio activo soluble", que se extrae del bacilo.
- 4.—Antígeno en suspensión oleosa.
- 5.—Dinitro 2-4 cloro-1-benceno.
- 6.—Lepromina enzimática, digerida o purificada.

Lleva la primera palabra en su estudio, Kensuke Mitsuda quien, en 1916, reportó sus investigaciones en el "Japanese Of Dermatology" y posteriormente hizo de ellos una relación a la Tercera Conferencia Internacional de la Lepra, reunida en 1923 en Estrasburgo.

Con el mismo fundamento de los trabajos de Mitsuda, han surgido posteriores investigaciones, ampliando o modificando las técnicas del famoso descubridor.

Observó Mitsuda, la diferente y característica manera de reaccionar a su prueba, por inyección de material leproso, en enfermos de los distintos tipos de lepra. Es así como este científico japonés, abre el capítulo relativo a la elaboración del antígeno, que lleva su nombre, en el que ciframos nuestras esperanzas, para trocarlo en el capítulo de la Antígenoterapia, a la que sustituyen, en la actualidad, los servicios de la Química, por lo cual son tratados los enfermos con el diazone o el promin.

El discípulo más próximo a Mitsuda, Fumio Hayashi, es al que se debe un estudio completo del Lepromin Test o Mitsuda, en el cual, el autor modifica la concentración bacilar del antígeno y hace especificaciones referentes al tiempo ideal para la lectura a la vez que de esta suerte entabla la polémica de los partidarios de la lectura precoz de la reacción y los detractores de ésta en apoyo de la lectura tardía.

Posteriormente, Dharmendra (11) muestra a los Leprólogos nuevos derroteros, cuando descubre que el cloroformo es un poderoso auxi-

liar para la extracción del bacilo de Hansen, contenido en los tejidos nodulares, lográndose, con su uso, un antígeno casi desprovisto de las proteínas tisulares, es la lepromina bacilar, de la que se derivan multitud de investigaciones. Con ella Dharmendra, continuó sus experimentos para extraer la fracción antigénica responsable de la especificidad y reacción del Mitsuda, llegando a la conclusión de que se trata de una núcleo proteína, a la que llama lepromina proteica purificada (16).

La colaboración de Muir, a los estudios de los investigadores anteriormente citados, resulta de trascendencia: Muir prepara la lepromina Integral, mediante manipulaciones de trituración de nódulos hervidos y secos y la pulverización de los mismos, hasta la obtención de un polvo fino, que constituye lo que pudiéramos llamar una nueva "Forma Farmacéutica".

La lepromina se aplica por vía intradérmica (0.1 cc.), a la altura de las dos terceras partes de la cara anterior del antebrazo, debiendo usarse testigo en el otro brazo, la misma cantidad y a la misma altura para excluir el posible factor de alergia tisular.

El sitio de aplicación de la lepromina hace variar la reacción de Mitsuda, se recomienda escoger sitios alejados de zonas de piel infectadas; próximamente a lesiones tuberculoides, son intensas y decrecen al retirarse del foco dérmico en cuestión. En igual forma a las áreas cercanas de actividad lepromatosa.

La zona escapular es también otro sitio de aplicación. En la cara anterior del antebrazo no es recomendable porque en caso de ser positiva deja muy visible la cicatriz de la reacción.

Hay entre los enfermos una gama intermedia de lectura que va comprendida entre la reacción positiva y la negativa, pero también los hay que la dan francamente positiva o enteramente negativa.

De hecho, hay algunas lecturas que no deben llamarse positivas o negativas; el resultado debe darse como Mitsuda de tantos milímetros, sin decir positiva o negativa. Solamente las características que presente la cuti-reacción unida a la experiencia clínica del especialista, hacen resumir el tipo de reacción de que se trata.

La prueba positiva de la lepromina puede producir dos tipos fundamentales de reacción: una precoz y otra tardía; la primera se observa a

las 24, 48 horas de inyectada, llamada también reacción de Fernández, correspondiendo generalmente a las 48 horas el máximo de actividad.

Semejante a la prueba de Mantoux, la reacción precoz de Mitsuda se manifiesta por una infiltración eritematosa central, rodeada por un halo de enrojecimiento periférico. Para unos especialistas esta última manifestación es ya un índice de reactividad.

La reacción tardía es propiamente la reacción de Mitsuda, o reacción nodular, se muestra con precisión a los 21 días, perdura la cicatriz atrófica por cierto tiempo, sus resultados son concordantes con la reacción precoz, pero menos constante y fue la primitivamente propuesta por Mitsuda Hayashi.

Se presenta como un nódulo de diámetro aproximado de 5 mm. pasando primero como pápula a partir de la primera semana de inyectado.

Resumen de la Importancia de la Lepromina. (13)

Después de diagnosticar clínicamente la lepra, la reacción de Mitsuda es completamente útil como prueba accesoria, es por esto que la lepromina tiene un alto valor pronóstico.

2.—Fundamentalmente es de naturaleza alérgica, que mide dentro de esa misma alergia el grado de resistencia al ataque del germen.

3.—La prueba de Mitsuda, la clínica, la anatomía patológica y la baciloscopia, son elementos de juicio que sirven para clasificar las formas clínicas de lepra: Tuberculoide, Lepromatosa, e Incaracterística.

4.—Souza Campos señala el valor pronóstico de la reacción en preventorios para hijos de enfermos de lepra, pues los que presentaron Mitsuda negativo 70 criaturas enfermaron en el periodo de 1936-45.

5.—La reacción precoz a la lepromina significa que el individuo ha estado en contacto con el bacilo de Hansen y por lo tanto ha sido sensibilizado al *Mycobacterium leprae*.

6.—La intradermo reacción de Mitsuda ha servido para afirmar las formas polares de la nueva clasificación de la lepra, manifestándose casi un 100% de casos positivos en los tuberculoideos y casi un 100% de casos negativos en los lepromatosos, incluyendo su gran utilidad en los Indeterminados.

7.—Los enfermos que primero presentan reacción positiva y luego pasan a ser negativos son excepcionalmente raros, como sucede con el tipo tuberculoide reaccionales que casi siempre dan reacción negativa, o como en los casos rarísimos de lepromatización de enfermos lepromino positivos.

8.—De aquí el estudio intenso que debe impartirse a la lepromina, como el estudio de su naturaleza química como antígeno que es, la normalización de técnicas y lecturas, corroborando factores inherentes a la lepromina, para después buscar los correspondientes al por qué de esas pequeñas divergencias en los resultados, hasta convertir el antígeno en prueba completamente útil o por el contrario descartarlo por una nueva de mayores cualidades.

COMPARACION DE DISTINTAS TECNICAS DE
PREPARACION DEL ANTIGENO.

TECNICAS DE PREPARACION DE LOS DIFERENTES ANTIGENOS.

METODO DE MITSUDA Hayashi:—Hierven durante 30 ó 60 minutos nódulos frescos en suero fisiológico. Trituran luego este material en un mortero y agregan suero fisiológico en la proporción de 20 cc. por cada gramo de nódulos. Filtran con gasa el preparado obtenido, lo calientan después a 60° durante una hora y agregan finalmente, ácido fénico en la proporción de 0.5%. Emplean 0.10 c.c. de este preparado por vía intradérmica por cada reacción.

METODO DE MUIR:

Un nódulo rico en bacilos, se hierve en agua durante 45 minutos, se corta luego en pequeños trozos que se secan al ventilador, primero y, después en una cámara al vacío con ácido sulfúrico; el material así secado se tritura en un mortero de vidrio hasta reducirlo a fino polvo, para preparar la suspensión se toman 0.40 g. de este polvo, se le agregan 10 cc. de suero fisiológico y se tritura en un mortero; se extrae el líquido con pipeta y al residuo sólido, que queda en el mortero, se le agrega suero nuevamente, repitiéndose la operación varias veces. La suspensión así obtenida se coloca en un tubo de ensayo con pipeta y se le agrega suero fisiológico, hasta completar 100 cc. añadiendo 0.5 de ácido fénico. El antígeno así preparado se envasa en ampollitas de 1 cc. cerrándolas a la llama y llevándolas finalmente al autoclave a 120° C. durante media hora.

METODO DE FERNANDEZ Y OLMOS.- PARA LEPROMINA BACILAR.

Hervir con agua nódulos lepromatosos durante 10 minutos. Quitar

la epidermis cortar en pequeños trozos y hervir 20 minutos más en la misma agua. Separar el material sólido del líquido. Triturar este material sólido en un mortero hasta reducir a pasta homogénea. Agregar al líquido en ebullición separado anteriormente suero fisiológico, hasta obtener un volumen aproximado de 30 cc. por cada gramo de material sólido. Llevar este líquido agregando cloruro de sodio purísimo, a la densidad de 1.050. Mezclar la pasta homogénea obtenida por trituración de los nódulos lepramatosos con este líquido y triturar en el mortero hasta obtener una suspensión. Centrifugar este material durante media hora a 4.000 revoluciones por minuto. Extraer con pipeta el líquido sobrenadante. Llevar este líquido, mediante la adición de alcohol a 100° a una densidad de 0.9500. Centrifugar este líquido durante una hora a 4.000 revoluciones por minuto y desechar al vacío el sedimento que queda constituido por bacilos puros hasta deshidratarlo por completo. Pesar exactamente este material seco. Triturarlo en mortero de ágata o de vidrio, hasta reducirlo a fino polvo. Con este polvo y bacilos se prepara, a la concentración que se desee el antígeno bacilar, a partir de la solución madre al 1%, que se obtiene de la manera siguiente. Se tritura en un mortero el polvo de una mezcla a partes iguales de glicerina y suero fisiológico fencado al 0.5% hasta obtener una solución homogénea; envasar en ampollitas y esterilizar al autoclave a 120° C. (la dilución que resulte más adecuada según las experiencias de los autores, es la de 1:5 de la dilución madre, es decir de 2:1000 del polvo bacilar).

METODO DE DHARMENDRA PARA LA LEPRROMINA BACILAR

Triturar en un mortero nódulos con cloroformo. Extraer el cloroformo pipeteando y depositarlo en la probeta. Agregar cloroformo al residuo, moler y pipetear. Repetir la operación varias veces hasta comprobar ausencia de bacilos en el residuo. (Se necesitan alrededor de 50 cc. de cloroformo para 2 gr. de nódulos.) Separar el cloroformo pipeteando y desechar el residuo. El residuo del cloroformo debe mostrar bacilos puros, sin detritus de tejidos. El cloroformo se hace evaporar a Baño de María, quedando un residuo que contiene lipoides y bacilos. Suspender este residuo en eter y centrifugar esta suspensión a baja temperatura, a 3000 revoluciones por minuto (en Calcuta lo hacen en un

refrigerader). Los lipoides permanecen en el liquido sobrenadante y los bacilos se depositan en el fondo. Pipetear el extracto etéreo. Para remover más completamente los lipidos, el residuo bacilar es nuevamente suspendido en éter, centrifugando, y el depósito bacilar separado y desecado; queda así un polvo seco constituido solo por bacilos. Para obtener la suspensión inyectable, se coloca una cantidad de este polvo en un mortero, agregando una gotas de solución N/10 de hidróxido de sodio, triturando con la mano del mortero y agregando suero fisiológico fencado hasta llegar a la concentración de 1 mg. de bacilos para 1 cc. de suero fisiológico. La suspensión se hace completando por trituración.

METODO DE FERNANDEZ Y OLMOS PARA LEPROMINA FILTRADA.

Cortar en pequeños trozos nódulos ricos en contenido bacilar, hervirlos en agua durante 30 minutos; quitar la epidermis. Triturar en mortero hasta reducir a pasta homogénea. Agregar agua destilada al liquido de ebullición hasta obtener un volumen total equivalente, aproximadamente a 10 c. c. por cada g. de nódulo fresco; triturar en mortero la pasta homogénea con este liquido hasta lograr una suspensión. Filtrar a través de gasa. El liquido así obtenido, filtrarlo a través de bujia L3. Concentrar este filtrado en estufa a 58 grados hasta reducir su volumen a la décima parte del volumen total de la suspensión primitiva. De esta manera se obtiene 1 c. c. de antígeno filtrado concentrado por gramo de nódulo fresco. Envasar en ampolletas, esterilizar en autoclave a 120 grados C. durante media hora.

METODO DE DHARMENDRA PARA LEPROMINA PROTEICA PURIFICADA.

El mismo procedimiento de este autor para obtener la lepromina bacilar, hasta la obtención del polvo seco de bacilos puros. A continuación triturar el polvo bacilar y hacer una suspensión en suero fisiológico. Dejando sedimentar se comprueba que una porción de este polvo bacilar es soluble en suero y que otra parte se deposita en el fondo. Separar la porción soluble pipeteando, después de haber dejado sedimentar. Mezclar un volumen igual de esta solución y de ácido tricloracético al 20% y dejar sedimentar durante una noche. Al día siguiente el pre-

cipitado se separa del líquido sobrenadante. El precipitado se lava con éter para quitar los restos del tricolorácetico y se disuelve en suero fisiológico agregando unas gotas de NaOH N 10. La concentración de esta solución es de 0.0133 gramos para 0.10 c. c.

PREPARACION DE LEPRROMINA BACILAR TIPO DHARMENDRA

Extirpación de lepromas ya sea con anestesia con novocaina o mejor sin ella, ya que con frecuencia esta insensible la región.

LEPRROMIA BACILAR. (De JOSE BARBA RUBIO)

Ebullición al Baño María durante 30 minutos cuando menos (habiéndose puesto previamente los lepromas con agua. Se pueden guardar indefinidamente los nódulos hervidos, agregando una gota de Feno! puro por cada 10 c. c. de contenido ya frío. A continuación se toma nódulo por nódulo sobre una caja Petri, y con un punzón y bisturí se limpian los nódulos quitando epidermis, pelos y tejido adiposo. Seguidamente se trituran los nódulos en pequeños trozos con el bisturí.

Se colocan los lepromas triturados en un mortero, se trituran, se agrega cloroformo, en cantidad necesaria, no fija; se trituran durante 10 minutos más en cloroformo para que se desprendan los bacilos del tejido de leproma; ese cloroformo se separa por decantado, se guarda en un vaso de laboratorio, se agrega más cloroformo en el mortero con lepromas, se continúa triturando para desprender más bacilos, se decanta, juntando el decantado en el mismo vaso junto con el anterior, y esta operación se repite durante seis u ocho veces, procurando de cada decantado, sacar una muestra y colocarla en un portaobjetos, para hacer coloración y ver si hay o no bacilos, que objetivamente se precisa cuando el cloroformo ya no es turbio ni lechoso.

Se deja la suspensión de bacilos en cloroformo en la estufa, hasta que se evapore todo el cloroformo (cosa que sucede alrededor de 20 hs.) quedando en el vaso un precipitado sólido, constituido por bacilos puros.

Lavado de bacilos, para quitar las grasas y los pigmentos de las grasas:— En seguida se colocan pequeñas cantidades de éter, en el

residuo sólido que quedó en el vaso, después de la evaporación del cloroformo, se agita hasta que se diluyan los bacilos en el éter, se vierte sobre un tubo de centrifuga, se coloca más éter en el vaso y éste se repite varias veces hasta que en el vaso no quede nada de precipitado. A continuación esa suspensión en éter se centrifuga durante 30 minutos a 2,500 o 3,000 revoluciones p. m., (como mínimo 2,000). Se decanta el éter que sobrenada, que es amarillento, café debido a los pigmentos de las grasas tisulares. Se agrega la misma cantidad de éter limpio, se agita, y de nuevo se centrifuga durante 30 minutos a 2,500 o 3,000 r. p. m. Esto se hace dos o tres veces, hasta quitar las grasas y demás sustancias. El líquido decantado se guarda aparte en un frasco, para cuando se tenga mucho residuo, hacer estudios investigando las sustancias que quita el éter:— grasas, pigmentos, etc.

El sedimento bacilar, que queda en el fondo del tubo, es lo que sirve para la preparación de la lepromina bacilar, se guarda en el mismo tubo dentro de la estufa para desecarlo.

Una vez desecado, cosa que ocurre en unas cinco o diez horas, se coloca el polvo bacilar en un mortero hervido, se muele durante quince minutos y a continuación se agrega suero fisiológico; gota a gota al principio, mientras se continúa moliendo, para emulsionar perfectamente.

Luego se pipetea la parte superior de la emulsión, o se extrae con jeringa y se agrega más suero fisiológico hasta tener lo necesario para que la concentración de bacilos sea al 2:1,000 (La Técnica de Dharmendra era de hacer la solución al 1:1,000).

Se agrega 0.5 c. c. (1.2 c. c.) de Fenol puro para cada 100 c.c. de lepromina.

Se envasa en ampollas procurando dejar un vacío grande, se cierra a la flama y se esterilizan dejándolas en el auto-clave a 120° C. durante 10 a 15 minutos. Después se colocará en frascos hervidos con tapón de hule.

EXPERIENCIA PERSONAL.

Las modificaciones llevadas a cabo en las leprominas Integral, Bacilar y Enzimática, van de acuerdo con los siguientes propósitos:

I.—El fundamental consiste en considerar a la lepromina como antígeno y no con la idea de modificar la elaboración clásica de Mitsuda (18).

II.—Tratar de obtener un antígeno controlable en su poder antigénico y su concentración, factores muy importantes en la preparación de todo antígeno.

III.—Considerar que la causa de las reacciones pseudo positivas, puede consistir en la alergia hacia las proteínas tisulares, lo cual corrobora la urgencia de un testigo.

IV.—Esterilización del antígeno que amerita un control bacteriológico de aerobios y anaerobios.

LEPROMINA INTEGRAL. METODO DE MUIR.

Los nódulos extirpados estérpticamente, se reúnen en un recipiente de boca ancha, o matraz Erlenmeyer de unos 121 c. c. conteniendo glicerina estéril neutra, en cantidad necesaria para cubrirlo. Así pueden conservarse sin dar lugar a la putrefacción.

Se maceran en Baño María a 56° C. con objeto de ablandarles la epidermis; puestos en caja de Petri se sujeta cada nódulo con el punzón y con ayuda del bisturi se retira la epidermis y el tejido adiposo.

Fracionados en pequeños trozos con las tijeras, se colocan en una caja de Petri y se someten a desecación en la incubadora a 37° C. o a una temperatura que no exceda de 56° durante tres días.

Ya secos, se maceran en glicerina a 56° hasta ablandarlos; se colocan uno a uno en el mortero, se trituran bien y se añaden pequeñas cantidades de glicerina hasta obtener una pasta; en tal forma se guarda para tomar de ahí las porciones necesarias del antígeno.

En un mortero de bicocho o de porcelana se coloca una pequeña porción de la pasta, según la cantidad de antígeno que se vaya a elaborar (de un núbulo se obtienen 100 c.c. de antígeno) y poco a poco, e incorporando con el pistilo del mortero, se adiciona una solución de cloruro de sodio al 9 x 1,000, libre de pirógenos, hasta obtener una emulsión opalina.

Con el objeto de evitar contaminaciones en el momento de repartir el antígeno, se coloca éste en un embudo de separación, aproximadamente de 150 c.c. de capacidad, lo que además contribuye a la sedimentación de las partículas más pesadas. Con este objeto se deja reposar un día y cuando ya esté sedimentado, se hace la separación hasta dejar un líquido lechoso turbio, cuya concentración se compara al nefelómetro de Mc. Farland.

Si aún está muy opalino, se adiciona suero fisiológico, hasta que su opalescencia sea igual a la de la segunda ampolleta del turbidímetro, o sea a la que corresponde una concentración de 600,000,000 de bacterias por c.c. Cuando se ha alcanzado tal concentración se adiciona el conservador, hecho lo cual se procede al envase. En cada frasco ampula de 5 c.c. de capacidad, se colocan 4 c.c. del antígeno, en condiciones estériles, y se obtura con el tapón de algodón; hecha la repartición del antígeno, se cierran los frasquitos con tapón de hule y se esterilizan en Baño María, a una temperatura de 50° C. durante tres días o más, hasta que el control bacteriológico de aerobios y anaerobios ponga de manifiesto la esterilidad.

NOTA.

Como la glicerina impide el desarrollo de la putrefacción, en lugar de someter los nódulos a la ebullición se conservan en glicerina. Esto queda corroborado por las grandes experiencias del investigador francés Luis Pasteur, cuando al preparar su vacuna antituberculosa, las médulas de los conejos rabiosos, sumergidas en glicerina, se conservan fuera de toda contaminación estando provisto, de este modo, de la vacuna

de poder antigénico que se requiere. Luego, al conservar los nódulos en glicerina, no solo se evita la putrefacción, sino que también se retiene el poder antigénico (2) (6).

2.—El pigmento de la piel del nódulo da mal aspecto al antígeno de ahí la necesidad de eliminarlo.

3.—Para igualar la turbidez a la segunda ampolleta del nefelómetro, se hacen previas pesadas de 0.4 g. del polvo (que es lo que indica la técnica de Muir) a esta porción se añaden unas gotas de glicerina y la pasta formada se incorpora a 100 c.c. de solución salina. Comparando su opalescencia al turbidímetro, se vió que corresponde a la segunda ampolleta de él.

4.—Siguiendo la técnica de Muir, (12) encontré que al pipetear el líquido sobrenadante, en ocasiones se absorben partículas gruesas del polvo, que obstruyen la aguja de la jeringa. Esto se corrigió dejando sedimentar las partículas toscas en el embudo de separación. Además, cada vez que se repetía la técnica para elaborar nueva cantidad de antígeno, la opalescencia de cada lote resultaba distinta, pero por comparación al turbidímetro, se pudo normalizar su concentración.

5.—El control bacteriológico llevado a cabo después de la esterilización al autoclave a 120° (15 libras) durante 15 minutos, acusó en algunas muestras germen vivo y en otras no, lo que probablemente depende de las condiciones de asepsia en que las manipulaciones se llevaron a efecto, por lo cual es suficiente la esterilización por el método de Thindal controlando después del tercer día, por siembra de aerobios y anaerobios para que se considere como autorizado, cuando va a acusar esterilidad.

6.—En la práctica es posible conservar el antígeno en la siguiente forma: Se vierte la suspensión de fuerte turbidez, obtenida de la lepromina Integral, en una frasco de vidrio resistente esteril. (2). En esta forma, las suspensiones muy concentradas del antígeno, provisto del antiséptico, pueden conservarse en el refrigerador con unas cuentas de vidrio para homogeneizar por agitación el "Concentrado Bacteriano" deshaciendo los grumos de polvo. Cuando se desea preparar nueva cantidad de antígeno, se usará el así conservado en frío, partiendo de una determinada porción del mismo, que se diluye con solución salina, para después someterla a la comparación nefelométrica.

LEPROMINA BACILAR

En la preparación de la lepromina Bacilar (12) se desperdicia gran cantidad de *Mycobacterium leprae*, esto lo demuestra la observación al microscopio de un frotis del líquido de ebullición, teñido por el método de Ziehl Neelsen.

Este desperdicio se corrige absteniéndose de la ebullición de los nódulos y limitándose a conservarlos en glicerina, mientras se reúnen los necesarios para iniciar la elaboración.

15 a 20 nódulos se maceran a 56° C., se les retira la epidermis y el tejido adiposo; se hace con ellos una papilla en el mortero y se procede a la extracción del bacilo para lo cual se adiciona cloroformo; el líquido lechoso que resulta, se separa en embudo de separación y se centrifuga a 3,000 revoluciones por minuto durante media hora.

Este líquido opalescente ya repartido en tubos de centrifuga, al ser observado contra la luz, recuerda las ondas Moiré del bacilo Tífico. En nuestra experimentación no obstante que se sometió el tiempo de centrifugación que indica la técnica, no se formó sedimento bacilar, sino por el contrario, los bacilos ascendieron a la superficie del cloroformo. Para investigar el por qué de esta anomalía, con este líquido se procedió a manufacturar algunos frotis, que, después de teñidos por el método de Ziehl Neelsen, se observaron al microscopio; tal examen reveló al *Mycobacterium leprae* modificado en su morfología con forma de sacos bacilares, fraccionados perpendicularmente en uno o en sus dos extremos; teñidos no tan característicamente como aparecen cuando el frotis proviene de un enfermo sin tratamiento. Consistió dicha modificación en presentar una coloración débilmente roja en los extremos y el centro bacilar incoloro. La periferia limitante del germen se observa ligeramente brillante, lo que se atribuye no solo a la evolución del bacilo, sino a las diversas circunstancias o artificios de manipulación como la molienda en el mortero, o al hecho, más probable, de haber trabajado con nódulos procedentes de enfermos anteriormente sometidos a tratamiento con diazone o promin, o también a que estas experiencias se hicieron con nódulos guardados durante seis meses.

Para corroborar la causa de estas modificaciones, se procedió a la preparación de frotis del exudado de la piel de enfermos sometidos por

algún tiempo a tratamiento sulfónico, de acuerdo con la siguiente técnica:

Se aseptica la piel sobre un nódulo, se izquemiza y se presiona con pinzas de Pean, se da un piquete y se toma el exudado con una porta-objetos, se fija, se tiñe; y al observarse al microscopio la misma modificación morfológica, citada anteriormente en la elaboración del antígeno, se percibe claramente llegando a alcanzar no solo la deformación, sino la completa pulverización del bacilo, debida al tratamiento sulfónico. En cambio, los casos de la enfermedad recientemente descubiertos muestran frotis de bacilos íntegros, con todas las características tintoriales y morfológicas; por lo que concluimos que esta modificación existe desde la extirpación de los nódulos en enfermos con tratamiento.

Así nos explicamos el por qué al ser centrifugados los bacilos, no se precipitan al fondo del tubo como lo hacen los de nódulos recientemente extraídos, sino que tienden a la superficie formando, en la zona superior del tubo, una capa amplia lechosa, claramente diferenciada del resto. La parte inferior del tubo es de color café amarillento, completamente transparente. Si se agita, la capa superior se pierde y se distribuye por todo el tubo, observándose brillante como al principio. Esto comprueba que los bacilos han perdido con el tiempo densidad hasta ser ésta menor que la del cloroformo (1455), ya que han quedado en la parte superior. Contrariamente a lo dicho, los obtenidos de nódulos recientemente extraídos, se sedimentan en el tubo a la misma velocidad durante media hora.

Después de centrifugar el líquido lechoso y decantar el cloroformo, el sedimento bacilar se suspende en éter, lo que da la apariencia de un fino espolvoreado brillante. Recordando la semejanza que guarda con el bacilo de Koch, en lo que se refiere a la envoltura cérica, la curiosidad me llevó a confirmarla. Para esto, a una porción de lepromina bacilar, agregué una proporción aproximadamente igual de éter sulfúrico, se agita y se deja reposar; se observa que los bacilos ascienden a la capa etérea. Solamente, por la naturaleza química de la envoltura cérica del bacilo sube al éter si no fuera cerosa, permanecería en la misma solución salina que lo lleva.

El aspecto coloidal de los bacilos en el éter, permanece por más tiempo que cuando va suspendido en solución salina; en ésta el polvo bacilar es más bien opalino y tiene tendencias a la sedimentación, sien-

do su espolvoreado no tan fino y brillante como cuando se observa en el éter.

El sedimento bacilar se trató con éter, para eliminar los pigmentos biliares; la coloración café, va disminuyendo con los lavados de éter, hasta quedar completamente cristalino.

El depósito bacilar, obtenido con centrifugación, posteriormente se suspende en suero fisiológico, se controla su concentración bacteriana, por comparación a la primera ampollita del nefelómetro, teniendo como base esta turbidez y no su peso; en esta forma podemos elaborar antígeno bacilar, a partir de un solo nódulo, sin necesidad de reunir los quince o veinte que requiere la técnica, eliminando así la balanza de precisión.

Se sigue controlando conforme lo indica la preparación general de un antígeno.

LEPROMINA ENZIMÁTICA, DIGERIDA O PURIFICADA.

El tejido nodular se somete a la digestión proteolítica, desintegrándolo sin recurrir a la ebullición.

La solución enzimática se prepara suspendiendo 0.1 g. de pepsina en 100 c.c. de agua destilada y estéril, se acidula con solución diluida de ácido clorhídrico, hasta obtener un ph de 2.1; si tal se hace con ácido sulfúrico éste comunica a los trozos nodulares un color rojo ladrillo.

Un nódulo, se fracciona en pequeños trozos y se incuba con la enzima proteolítica, a 40°C por 2 días, transcurridos los cuales, se observa flotar los trocitos en la superficie del líquido. Vistos al través del matraz, dan la impresión de que no han sido atacados por la enzima, pero al ser presionados contra las paredes, mediante un agitador, se manifiestan completamente ablandados.

En la superficie del líquido se forma una capa de aspecto grasoso, cuyo frotis teñido al ser observado con ayuda del microscopio, se revela amarillo con estructura semejante a la del tejido adiposo.

Los trozos nodulares digeridos, se homogenizan en el mortero, obteniéndose fácilmente una fina papilla, que se suspende en solución salina y se completa el volumen a 100 cc. El envasado es sometido a las reglas, ya citadas, de preparación y control.

El estudio de la lepromina enzimática nos inclina a pensar que el jugo gástrico no ataca al germen de la lepra, contrariamente a lo que científicamente se conoce de esto, sabido es que:

Cuando un antígeno es introducido por vía oral, se encuentra en el tubo digestivo con las secreciones de las glándulas, capaces de provocar la demolición digestiva de su arquitectura química, con pérdida de su facultad antigénica, tendiendo a convertirse por la digestión, en una sustancia asimilable, semejante a la de los tejidos, o en material propio a las combustiones que mantienen la vida. Para que un antígeno pueda atravesar el estómago sin sufrir la acción del jugo digestivo, deberá administrarse fuera de la alimentación o protegerse por medio de una envoltura entérica, o de una sustancia como el Salol, inatacable por el jugo gástrico (2).

Si la pepsina no ataca al germen de la lepra, hay un tanto para afirmar que es el estómago la puerta de entrada de la enfermedad. Si se completara el estudio de la pepsina, podría afirmarse que una de las vías de contagio es la oral. Mientras no conozcamos la puerta de entrada del germen, no se sabrá atacar la enfermedad (2).

Sin embargo: Sachs cree que la proteína, a cuya unión debe el lípido su facultad antigénica, tiene débil unión con él, por absorción y la llama por esta causa "Proteína Remolcadera" o "Protectora". Sevag piensa que la actitud antigénica está íntimamente ligada a la catalítica, y cree que los enzimas y los antígenos no solo pertenecen a una misma clase de catalizadores, sino que constituyen una misma cosa. Se funda entre otras razones, para opinar de esta manera, en la alta especialidad de las reacciones enzimáticas, paralelamente a la que tienen las reacciones antígeno-anticuerpo, en el hecho de que en los seres vivos se comprueba que la acción zimótica da lugar, como la antigénica, a la formación de sustancias que inhiben específicamente la actividad del agente enzimo o antígeno, que les dió origen; y tales hechos le han llevado a presentar el fenómeno de la inmunidad bajo un aspecto relativamente nuevo, creando el término "Inmuno-Catalices" (Inmuno Catalysis By M. G. Sevag Ph D. 1945). (2).

Control de Esterilidad practicado en las Leprominas.

Resultados del control bacteriológico practicado en cada Lepro-

mina, aplicando distintos métodos de esterilización con objeto de compararlos y elegir el más a propósito para este antígeno.

Abreviaturas:

- 1.—L. I.—Lepromina Integral.
- 2.—L. B.— " Bacilar.
- 3.—L. E.— " Enzimática.
- 1.—L. I.—10 min. 108°C
- 2.—L. I.—15 min.
- 3.—L. I.—10 min. 115°C
- 1.—Aerobios — estéril.
- 4.—L. I.—15 min. 2.—Anaerobios — contaminado.
- 5.—L. I.—Hervidos 5 min.
- 6.—L. I.—Hervidos 10 min.
- 7.—L. I.—Hervidos 15 min.
- 8.—L. I.—Hervidos 20 min.
- 9.—L. I.—Hervidos 25 min.
- 10.—L. B.—Congelación y descongelación.
- 11.—L. I.—Congelación y descongelación.
- 12.—L. B.—Por tindalización.
- 13.—L. I.—Por Tindalización.

En todos estos antígenos el control bacteriológico acusó esterilidad, seguidos por métodos de tindalización, congelación y descongelación, ebullición y llevados al autoclave. Sin embargo, algunos antígenos llevados al autoclave salieron contaminados:

- 14.—L. I.— 5' — 5 lbs.
- 15.—L. I.— autoclave.
- 16.—L. B. E.—autoclave.
- 17.—L. B.— Congelación y descongelación.
- 18.—L. I.— Congelación y descongelación.
- 19.—L. I.— Autoclave.

Comparando estos resultados, con los anteriores, observamos que la esterilidad depende, más bien, de las condiciones asépticas bajo las cuales se trabaje; pues muchas veces son suficientes 5 minutos de ebullición; por el contrario, en ocasiones 15 minutos a 108°C, no logran conseguirla.

Como todas las proteínas, excepto las protaminas, la gelatina y al-

gunas histonas son antígenos, (2) al ser coaguladas tales proteínas por el calor, pierden su poder antigénico.

La lepromina es un antígeno sumamente estable que soporta la temperatura y la presión, sin destruir completamente su poder antigénico, ya que al ser sometido en esta forma cuando se aplica, responde, estimulando a la formación de anticuerpos lo cual queda de manifiesto en el Mitsuda positivo, aunque se pueda percibir que la positividad decrece con estos factores. Se descubre su gran actividad en la preparación de la Lepromina Enzimática, en que el antígeno es cristalino y no obstante tal transparencia alcanza a despertar positividad.

El esqueleto químico del mosaico antigénico acaso sea muy delicado, pero sabiamente la naturaleza lo ha protegido con una capa cérica, que le permite conservar su integridad antigénica por lo menos en parte aún sometido a presión y calor, igual acontece con el bacilo de la tuberculosis, con quien guarda alguna semejanza.

Como método de esterilización se empleó además, el de la acción alternativa de congelación y descongelación, para así aprovechar el lizado del antígeno. El estado coloidal o la fina opalescencia que presentó el antígeno, se rompe por este procedimiento y, presenta un granulado difícil de homogeneizar por agitación, claramente perceptible a la vista que recuerda al floculado de la reacción serológica llevada a cabo por el método de Kahn, con una positividad de cuatro cruces.

La lepromina esterilizada por este método no se siguió aplicando, debido a que descendió su poder antigénico, por lo cual se usó posteriormente como testigo Lepromina Integral de antemano controlada.

DISCUSSION

Así como la misión del médico, consiste en profundizar acerca de la anatomía y la fisiología humana, así como la del químico está referida al estudio de la constitución del átomo y sus órbitas electrónicas, los protenes y los neutrones corresponde al Inmunólogo la investigación consagrada a la anatomía estructural y las diversas funciones de las bacterias. Para ello, ha de construir modelos que, aunque rudimentarios, le son útiles como fundamento de la constitución bacteriana porque, aún careciendo de una noción completa y exacta de tal arquitectura, ha podido con ello solucionar muchos enigmas inmunológicos, basados en el concepto del antígeno e inmunidad.

Inmunidad es el proceso biológico por el que un individuo resiste la acción nociva que en condiciones semejantes se muestran patógenos para otros individuos de la misma o de diferente especie (2).

Alergia o anafilaxia es un fenómeno biológico por el cual la introducción, generalmente por la vía parenteral, de un antígeno, que antes ha estado ya en contacto con los tejidos del individuo, lejos de encontrar la protección habitual en la inmunidad, origina manifestaciones de intolerancia de las cuales las hay en ocasiones mortales.

Se considera como antígeno a toda sustancia de constitución química, extraña a la del organismo, que penetrando en éste, hábitualmente por la vía parenteral, provoca la formación de agentes específicos, que neutralizan, destruyen, e inmovilizan al antígeno y reciben el nombre de anticuerpos.

Se da el nombre de antígeno completo a toda sustancia, generalmente proteína heteróloga (distinta en su arquitectura química a las que constituyen los tejidos del sujeto inyectado) que, introducida por vía distinta de la oral, genera anticuerpos, con los que reacciona tanto en el organismo vivo como *in vitro*.

Antígeno incompleto o Hapteno en toda substancia, radical, o elemento, incapaz, por si solo, de producir anticuerpos, pero que articulado a una proteina, forma un complejo con actividad antigénica y origina un anticuerpo que reacciona in vitro frente al hapteno libre del complejo.

Antígenos heterogénicos.—Ocupan lugar aparte ciertas sustancias, que inyectadas a un animal, producen anticuerpos capaces de reaccionar, no solo frente al antígeno que se utilizó, sino también frente a otros, muy distintos en apariencia. Inyectando al conejo un extracto de riñón o hígado de cuyo o de caballo, se produce una hemolisina muy activa para los glóbulos rojos del carnero. Los antígenos como éstos se llaman heterogénicos, o de Forsmann. (1) (2).

El inmunólogo, de acuerdo con lo expuesto, considera al cuerpo bacteriano no como un todo uniforme, sino dividido en distintas porciones antigénicas de constitución química específica, porciones que, al ser aplicadas, tienen función muy distinta. Esta función delicadísima, es la que cuida el inmunólogo para obtener el éxito de sus antígenos.

Según las definiciones anotadas, la lepromina es un antígeno, y, por lo tanto, debemos considerarlo conforme a su valor y sus cualidades y evitar los factores que la modifican, para prepararla en las mejores condiciones y obtener de ella el máximo rendimiento de utilidad. Aunque no por el hecho de presentar dificultades para su preparación, debe descartarse como inútil en Dermatología.

Al aplicar un antígeno podemos recoger la respuesta de anticuerpos, específicos e inespecíficos, según sea el estímulo del antígeno introducido. El resultado es el reflejo de las fracciones antigénicas que lleva la lepromina y de la capacidad de reaccionar del enfermo; estos dos factores son fundamentales en la lectura.

Si el antígeno está perfectamente elaborado, conservando su arquitectura química, podemos confiar en el resultado, pero si mutilamos sus fracciones antigénicas, su respuesta tal vez induzca a error.

Si los procesos de ebullición de los nódulos y el de esterilización al autoclave, cuecen la proteina específica del cuerpo bacilar, la lectura del antígeno será distinta a la obtenida con la proteina cruda; estas fracciones son sumamente específicas, y las responsables del movimiento del mecanismo productor de anticuerpos.

Inmunológicamente, con la lepromina no se han hecho experiencias que nos resuman qué clase de antígeno es, pero cualquiera que sea su definición, siempre interviene una proteína que actúa ya sea físicamente como sostén al hapteno o químicamente entre hapteno y anticuerpo.

Con objeto de aclarar los conceptos, recordemos aquí las teorías clásicas de las reacciones de antígeno y anticuerpo y su aspecto moderno (1).

De acuerdo con esto, intentaremos razonar la síntesis del siguiente cuadro sinóptico, que abarca algunos puntos concernientes a la integridad antigénica, cuyo análisis facilitará la aplicación al mosaico antigénico de la lepromina (1).

- 1.—Naturaleza química de la fracción antigénica activa.
- 2.—Lugar o posición que ocupa esa fracción antigénica en el cuerpo bacilar.
- 3.—Proporción que guarda ese antígeno con respecto a la unidad bacteriana.
- 4.—De la presencia, número y clase de otros componentes antigénicos en la bacteria.
- 5.—Del estado coloidal que guarda el antígeno.
- 6.—Formolización.

1.—Todas las proteínas excepto las protaminas, la gelatina y algunas histenas, son antígenos. Entre los productos de demolición de las proteínas, solamente los más elevados, como las albumosas, pueden serlo. Las fracciones más pequeñas, sobre todo si pierden el estado coloidal aún cuando su peso molecular permanezca alto, dejan de tener actividad antigénica (2).

Los antígenos completos son por su naturaleza: proteínas o tienen un componente proteico.

¿Inmunológicamente qué es la lepromina?

Si es un antígeno completo, interviene en su estructura química una proteína; por lo tanto, al preparar la lepromina, como no debemos mutillar la integridad antigénica, es menester observar cuáles son las propiedades físicas y químicas de las proteínas.

Las proteínas constituyen un grupo de sustancias sumamente complejas, químicamente son constituyentes esenciales del protoplasma, y

así como son alimentos fundamentales, se caracterizan porque al ser hidrolizados producen amino-ácidos. Según sus propiedades físicas y químicas se les clasifica en tres grupos: proteínas simples, proteínas conjugadas y proteínas derivadas. Entre ellas, unas son atacadas por el calor, otras no. (9).

Tomando en cuenta que la fracción antigénica específica de la lepromina es un núcleo proteína (Dharmendra) (16), revisaremos sus propiedades para evitar su mutilación durante el proceso de elaboración de la lepromina.

Las núcleo proteínas, como su nombre lo indica, son constituyentes esenciales del núcleo de las células vegetales y animales. Se encuentran en abundancia en los virus y en las bacterias. La hidrólisis de una núcleo proteína nos da primeramente una proteína y posiblemente una nucleína, ya que las núcleo-proteínas son hetero-prótidos, cuyo grupo prostético son los ácidos nucleínicos (9).

Resumiendo. No todas las proteínas son coagulables por el calor, en el caso de la lepromina ¿qué clase de proteína es su antígeno específico?

Si es una núcleo-proteína, ésta, al desdoblarse, origina siempre una proteína; luego debemos observar la temperatura para no coagularlas y así obtener especificidad entre antígeno y anticuerpo en el momento de leer el Mitsuda.

En la célula neumocócica, el anticuerpo correspondiente al Hapten polisacárido posee alta virtud protectora, en cambio, el anticuerpo correspondiente al antígeno núcleo de proteína posee poca o ninguna eficacia protectora (Very y Morgan 1925; Ven y Neil, 1925).

Luego, en el caso de la lepromina, para no predecir que se trata de una núcleo-proteína digamos tan solo de la existencia de una naturaleza química antigénica susceptible de mutilarse por muchos factores.

La especificidad de las reacciones de antígeno y anticuerpo depende de la estructura química de los agrupamientos particulares llevados por el antígeno (los grupos hapten) y correspondientes a los grupos de combinación llevados por el anticuerpo (1) (2).

(1) (2) Teniendo en cuenta que, en la mayoría de las especies, bacterianas, la fracción o las fracciones antigénicas que interesa conservar son termolábiles, la esterilización de las suspensiones bacterianas se hace calentándolas en B. M. a 58° C. durante una hora, o solo a 52° durante mayor tiempo, o sometiendo las suspensiones a calentamiento discontinuo a 50° una o dos horas, cada día, durante tres consecutivos (2).

Tomando en cuenta la fracción o fracciones antigénicas de especificidad y aplicando estos conocimientos en la preparación de la lepromina, debemos siempre interesarnos por conservarlos.

Solamente haciendo estudios del poder antigénico que prevalece a diferentes temperaturas, podemos llegar a concluir que tal temperatura y presión no modifican su integridad como antígeno.

En resumen: la elaboración de un antígeno con todas sus cualidades, sin mutilar la estructura química, o sea, sus agrupamientos antigénicos o haptenes, de acuerdo con la susceptibilidad del mosaico en el viraje de sus propiedades, será la responsable de la especificidad de reacción antígeno-anticuerpo (lectura de Mitsuda).

2.—Es en la superficie de la célula bacteriana, donde ésta reacciona con los anticuerpos situados en el fluido que la rodea. Hemos observado que el modo de obrar inmunológico de una célula normal, o cualquiera de sus variantes, está determinado por el carácter de los antígenos superficiales. Y tal aseveración se apoya también en el hecho, de que los anticuerpos producidos, como resultado de inocular bacterias, en animales de laboratorio, parecen corresponder a la superficie bacteriana, más que a las bacterias como un todo (1).

3.—La formolización de los sueros provoca, según el procedimiento seguido para realizarla, modificación en la especificidad, semejante a la que provoca el calentamiento del antígeno, pero distinta a la que causa la halogenación o la nitración. No sólo es modificando la arquitectura química, sino alterando el equilibrio coloidal y abocándolo a la gelificación, como obra el formol.

Hay una etapa de pre-gelificación, ostensible al ultramicroscopio o

al fotómetro, en la que puede un antígeno modificar su capacidad de reaccionar con el anticuerpo respectivo. (2).

4.—Pequeñísimas cantidades de proteínas tisulares, escapadas al triturar los nódulos en el mortero, son probablemente suficientes para dar reacciones pseudo positivas, en los individuos que presentan alergia a las proteínas.

La L. bacilar aparentemente va libre de tejido nodular, pero como provoca reacciones pseudo-positivas como la L. integral, nos autoriza a pensar que en el mortero trituramos parte de las proteínas en cuestión y aún cuando esto sucede en ínfimas cantidades, éstas son suficientes para revelarse en la intradérmico-reacción.

Y hacemos esta suposición en reacciones que el mismo inmunólogo lleva a cabo en su laboratorio, como son las sero-reacción de Ascoli y algunas de aplicación en problemas legales.

La reacción de Ascoli pone en evidencia las proteínas en el líquido que resulta de filtrar los trozos del tejido carbonoso hervidos en suero fisiológico. Las pruebas legales aludidas, son las referidas al hecho de que, las proteínas recogidas de manchas de sangre, se revelan aún a diluciones de 1: 10,000.

Luego, probablemente la lepromina bacilar está provista de proteínas tisulares responsables de la pseudo reacción.

5.— La L. Integral es tan específica como la L. Bacilar.

La adición de radicales o de elementos a las proteínas no suprime su actividad antigénica, cuando el compuesto resultante es soluble y conserva el estado coloidal. Así la caseína, la sal de ácido fosfórico de una proteína, así como muchas nucleoproteínas de los tejidos o de las células, son antígenos (1) (2).

Los cambios físicos, que no alteran la estructura química ni el estado coloidal, no suprimen la capacidad antigénica, aún cuando pueden ampliarla, comprendiendo, dentro de su acción, tanto al antígeno en su estado normal, como supongamos, modificando por el calor (2).

La adición de radicales o de elementos a las proteínas en la L. Integral, se podría referir a la adición del polvo del tejido nodular, lo cual no desmerece su poder como antígeno específico.

Con mucha razón se piensa que la L. Integral, es un antígeno que puede apropiarse, del medio donde vegeta, fracciones antigénicas des-acostumbradas en él, como es el polvo nodular, transformándose por esto en menos específico que la L. Bacilar, o en antígeno heterogéneo, pero, en realidad las dos leprominas llevan este tejido extraño que, las hace adolecer del mismo error, una con mayor cantidad que la otra; sin embargo son ambas cantidades suficientes para acusarse.

Verdaderamente la pluralidad antigénica no es la excepción sino la regla, por lo que, Landsteiner aseguraba que en realidad los antígenos son verdaderos mosaicos antigénicos (2).

Dos sustancias muy diferentes, pueden tener una o varias fracciones antigénicas comunes, y dar lugar a anti-cuerpos capaces de reaccionar frente a una o la otra, de manera que, en apariencias, se viola el carácter de especificidad antígeno-anticuerpo.

El bacilo de la tuberculosis y el de la lepra con ciertas semejanzas entre sí, pueden llevar esta fracción antigénica común, y tal vez por esto, los autores que hicieron el estudio comparativo de la reacción Mitsuda con las reacciones tuberculeas, encontraron que la tuberculina incrementa la positividad del Mitsuda; o al contrario (10) (11).

En los individuos supuestos indemnes de lepra, procedentes de un país en el que la lepra no es endémica, la reacción del Mitsuda acusa un índice de positividad tan elevado como el que se observa en la población sana de los países endémicos (13).

El mismo concepto de pluralidad antigénica o mosaico antigénico, nos hace pensar que solamente la presencia de fracciones antigénicas comunes, son las responsables de la iso-aglutinabilidad en los bacilos del Eberth y Paratíficos, así como en la Rickettsia y el Proteus (2).

Luego, es probable que el bacilo de la tuberculosis, emparentado botánicamente con el de la lepra (*Mycobacterium*) lleven la misma fracción antigénica, por lo que registran incremento en la positividad de las cuti-reacciones de la Lepromina y el Mantoux.

CONCLUSIONES

A.—URGE UN TESTIGO.

1.—La Lepromina debe acompañarse del testigo, para eliminar el posible factor de alergia hacia las proteínas tusulares.

2.—Solamente en presencia de este testigo deberá iniciarse el estudio.

3.—Ya que la temperatura baja el poder antigénico de la Lepromina se sugiera el Anacultivo principalmente para personas sanas.

4.—El testigo podrá excluir la pseudo-positividad que presentan algunos enfermos lepromatosos, y reacciones falsas debidas tal vez a la alergia proteínica.

5.—En los enfermos tipo tuberculoide pudieran presentar además esta clase de alergia proteínica, pero su Mitsuda Positivo la enmascara.

6.—Es importante este estudio porque podría hacerse la comparación entre el porciento de positivos tanto en enfermos lepromatosos como en tuberculoides, buscando la relación con el tipo clínico a que pertenecen.

B.—COMPARACION DE TECNICAS.

1.—Comparando la Lepromina Integral, Bacilar y Enzimática, tanto en sus técnicas como en sus resultados creo reúne mejores cualidades la Lepromina Integral, seguida por el método de Muir con algunas modificaciones que se estudian más adelante.

2.—El fundamento para elegir esta Lepromina es que tanto ésta como la Lepromina Bacilar que es la usada como modelo en distintos países, presentan los mismos errores de alergia proteica.

3.—La técnica de preparación de la L. Integral que lleva como fondo la idea de Mitsuda y que no el tanteo fué la primera técnica dada a conocer en el mundo de la Leprología pareció ser la más sencilla.

4.—Se encontró también que el por ciento de antígeno que rinde la Lepromina Bacilar es de un 50%, en tanto que la L. Integral da un rendimiento casi de 100%.

5.—La mayor opalescencia que da la L. Integral se vio útil para controlar su concentración, dato muy necesario para la preparación de un antígeno.

6.—La Lepromina Enzimática es una técnica rápida en su preparación y que da buenos resultados, se descartó debido a su aspecto cristalino.

VENTAJAS DE LAS MODIFICACIONES SEGUIDAS.

Se escogió la L. Integral por parecer más útil y se hicieron algunas modificaciones.

1.—Guardando los nódulos en glicerina estéril neutra se impide el desarrollo de la putrefacción y al mismo tiempo no se destruyen el poder antigénico.

2.—Los nódulos son ablandados por maceración a 50-56°C en lugar de hervirse.

3.—En la esterilización da el visto bueno el control de aerobios y anaerobios.

C.—CONTROL DE CONCENTRACION BACTERIANA.

1.—Controlando la turbidez del antígeno por comparación nefelométrica se logró estandarizar la opalescencia de varios lotes de Lepromina.

2.—La concentración por el método de las pesadas no dio en los distintos lotes, opalescencia uniforme, dando también lugar a contaminaciones.

3.—El embudo de separación usado en la repartición del antígeno fue de utilidad, pues fácilmente se eliminan por sedimentación las parti-

culas más toscas del polvo quedando solo un líquido opalescente. Este concentrado se lleva a la turbidez deseada por simple adición de suero fisiológico.

4.—Considerando que el ácido fénico es tóxico y también la extremada sensibilidad de la piel, se sugiere la glicerina o el alcohol a 65% o el propilén glicol como conservadores del antígeno.

D.—CONTROL BACTERIOLOGICO.

1.—Es necesario el control de esterilidad, pues en esta forma se excluye un posible factor de pseudo-positividad. Se considera que el autoclave no es el medio ideal para esterilizar un antígeno.

2.—La L. Integral y la L. Bacilar, presentan proteínas tisulares, por lo tanto, ambas llevan los mismos errores de alergia, por lo mismo la L. Integral tiene una especificidad igual a la L. Bacilar.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.—Topley, W. W.
Elementos de Inmunidad.
Madrid, Espasa Calpe, S. A. 1935.
- 2.—Paz, F.
La Inmunidad
Sus aplicaciones.
México, Ed. Nacional, S. A. 1948.
- 3.—Wilkinson, F. F.
Estudio crítico de la cultivabilidad del bacilo de Hansen.
Buenos Aires, (Tesis), 1941.
- 4.—International Journal of Leprosy
Vol. 16 N° 1, 40.
January-March 1943.
- 5.—Latapi, F.
Clasificación de la lepra.
V. Congreso Internacional de Lepra
Habana, Cuba.
- 6.—Hidalgo M. M. C.
Apuntes de clase, 1949.
- 7.—Cabrera G.
Apuntes de su clase de Farmacodinamia, 1949.
- 8.—Hernández Zurita, F.
La reacción de Mitsuda
México, (tesis), 1943.
- 9.—Advances in protein chemistry
M. L. Anson, J. T. Edsall
New York, Academic Press, Inc. 1944.
- 10.—Fernández, J. M. N.
Influencia del factor tuberculoso sobre la reacción a la lepromina.
Rev. Argent.- norteam. cien. méd.
1:592 — 600, 1943.
- 11.—Fernández, J. M. M.
Estudio comparativo de la reacción de Mitsuda, con las reac-

- riones tuberculinicas.
 Rev. argent. de dermatosif.
 Tomo XXIII — 3a. parte, 425, 1939.
- 12.—Fernández, J. M. M. y Augusto Serial.
 Lepromino reacción.
 Rev. argent. dermatosif.
 28:325-333, 1944.
- 13.—Dharmendra y S. S. Jaikaira.
 Estudios sobre el lepromin test en personas sanas en zonas
 endémicas y no endémicas.
 Indian Leprosy J. M. Research.
 13: 40, 1941.
- 14.—Rabello, Jr., E.
 Lepra tuberculoide su significado práctico y doctrinario
 Arquivos Mineiros de leprologia
 Año 1, 49, 1941.
- 15.—Dharmendra, M. B.
 Preparación y estandarización de la lepromina.
 Indian Leprosy J. M. Research
 13: 77, 1941
- 16.—Dharmendra, M. B.
 El principio activo de la lepromina es un antígeno proteínico
 del bacilo.
 Indian leprosy J. M. Research.
 le: 77, 1941.
- 17.—Fernández, J. M. M. y S. Schujman.
 Preparación de lepromina bacilar tipo Dharmendra.
 Temas de Leprologia.
 Julio del 17 al 25, 1946.
- 18.—Ayanegui, E. A.
 Legislación de Salubridad.
 Méx co. Public. leg. salubr. higiene. Méx. D. F., 1945.
- 19.—L. de Souza L. e Nelson de S. Campos.
 Diagnóstico clínico, laboratorial e biológico.
 Tratado de leprologia.
 Río de Janeiro, vol 3, Tomo I. 63, 67.
- 20.—Sosas, P. L.
 Reacción precoz al Mitsuda cuantitativo.

- México. (Tesis). 1946.
- 21.—Dharmendra, M. B. y S. Lowe.
Resultados del test de Mitsuda en casos de
Lepra de diferente tipo clínico.
Indian J. M. Research.
13:3, 1942.
 - 22.—Dharmendra, M. B., J. Lowe y N. Mukherji.
Variaciones en los resultados del test de Mitsuda.
Observaciones en casos de lepra del tipo neuro-macular.
Indian J. M. Research.
 - 23.—Dharmendra, M. B., J. Lowe y N. Mukherji.
14: 86, 1942.
Tentativas realizadas en casos de lepra, para
aumentar la reacción a la lepromina por la re-
petición de los test.
Indian J. M. Research.
14: 86, 1942.
 - 24.—Dharmendra, M. B. y S. S. Jaikaira.
Resultado del test con varios antígenos, en no convivientes.
Indian J. M. Research.
15:40, 1943.
 - 25.—Fernández, J. M. M., N. Olmos Castro.
Estandarización de la lepromina.
Rev. Argent. dermatosif.
Tomo XXV, 3a. parte, 1941.
 - 26.—Wade, W. H.
El examen bacteriológico en la lepra.
Leprosy review.
6: 54, 1935.
 - 27.—Lowe, J. y M. B. Dharmendra.
Estudios sobre el lepromin test.
Indian J. M. Research.
12. oct., 121-137, 1942.
 - 28.—Rabello. (Jr.)
Lepra tuberculoide, su significado práctico y doctrinario.
Arquivos mineiros de Irpología.
Año 1, 49, 1941.
 - 29.—Schujman, S.
Dermatosis que simulan lepra.

- (a propósito de algunas observaciones).
No. 6 temas de leprología.
Buenos Aires, 1943.
- 30.—Rodríguez, J. v F. C. Plantilla.
La prueba de la histamina como ayuda en el diagnóstico de los primeros síntomas de la lepra.
International Journal of Leprosy.
1: 49, 1933.
- 31.—García Miranda A.
Valor de la prueba de la lepromina.
Rev. sifi. leprol y dermat.
Año 3, núm. 3 Julio, 120, 1946.
- 32.—Mom y Basombrio.
Estudio de reactividad cutánea en lepra.
Las intradermo reacciones provocadas por la lepromina y el dinitro 2-4 cloro-1-benceno.
Rev. Argent. dermatosif.
Junio, 120, 1945.
- 33.—Nelson de Souza Campos
Resultados de lepromin test nos preventorios de filhos de prosos.
Rev. bras. lep., 31, 1948.
- 34.—De Souza Lima M.
Estudio criticio del test lepromina
Rev. bras. lep., 433, 1938.
- 35.—Dharmendra y S. Lowe.
Resultados del test de Mitsuda en casos de lepra de diferente tipo clínico.
Public Patronato de Leprosos, Nov. 1945.
- 36.—Muir, Ernest.
Manual of Leprosy.
Edinburg, E. & S. Livingstone L. T. D., 1948.
- 37.—Horta, Carlos A.
Diagnóstico Clínico laboratorial e inmunobiológico de Lepra.
Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1944.
- 38.—International Journal of Leprosy
Vol. 16 No. 3, 361.
July-September 1943.