

Aislamiento y Cultivo de las Leptospiras y Diagnosis Experimental del Icterus Infeccioso

del

Prof. Dr. Erwin Zimmermann

(Recibido por la Redacción el 20—VIII—37)

La espiroqueta en cuestión fué observada por primera vez por Wolbach y Binger (1914) en agua filtrada; estos autores la denominaron *Espiroqueta biflexa*. Más tarde, Uhlenhuth y Zuelzer (1919) descubrían nuevamente la misma espiroqueta saprófita, llamándola *espiroqueta-pseudo-icterogenes*. Inada e Ido (1915) y separadamente de éstos Uhlenhuth y Frome, Hübener y Reiter (1916) descubrieron también, como agente del icterus infeccioso, una espiroqueta de morfología idéntica a la que describiera Weil en 1886. Los autores japoneses llamaron a dicho agente *espiroqueta ictero-haemorrhagiae*; los otros autores le dieron el nombre de *espiroqueta icterogenes*. Noguchi (1917) propuso incluir en el orden de las espiroquetas a esta espiroqueta de morfología tan característica, con el nombre de Genus *Leptospira*. Por su forma tan especial, adoptaremos también nosotros esta última nomenclatura, que está muy en uso. En el año 1920 describía Noguchi a la *leptospira icteroides* como agente de la fiebre amarilla; hoy día se sabe con seguridad que aquello era un error. Más tarde, Klarenbeek y Schüffner (1932) descubrieron una espiroqueta especial en el perro, la *leptospira canicola*, que se caracterizó por sus propiedades serológicas variables y que también podía aparecer en el hombre. No continuaré mencionando la *leptospira heptomadis* y otras espiroquetas de esta especie.

A pesar de que las leptospiras son coloreables según el método de Giemsa, una preparación de esta especie no nos permite

distinguir fácilmente los detalles morfológicos. El examen en vivo en campo obscuro resulta de mayor provecho. Por término medio, el largo de las leptospiras alcanza apenas el diámetro de dos eritrocitos, a veces son aún más cortas, pero siempre extraordinariamente finas. Su forma es muy característica. Su parte central estirada presenta numerosas sinuosidades finísimas y regulares, terminando sus dos extremos doblados en forma de ganchos. Extraordinariamente característica es su movilidad propia, que se observa al campo obscuro. La imagen de movilidad se asemeja a un ocho estirado exageradamente a lo largo; estas leptospiras efectúan un movimiento de rotación a lo largo de su eje, permanecen en el mismo sitio o avanzan y vuelven moderada y regularmente. Cuando el movimiento es lento o en leptospiras muertas, se evidencia fácilmente la forma de doble gancho. Sólo con ayuda de una buena óptica y con iluminación propicia, pueden reconocerse las finas sinuosidades, viéndose entonces la espiroqueta semejante a una fina cadena de perlas.

Al practicar el examen de fondo obscuro de exudados y preparaciones sanguíneas, debe prevenirse una confusión con las llamadas "pseudo-espiroquetas". También en preparaciones de sangre normal se encuentran siempre formas de hilos, que presentan una movilidad comparable al movimiento que efectúa una cinta de papel fija en agua corriente. Quien ha visto algunas veces las leptospiras poderosamente luminosas en su movimiento tan característico de rotación activa, no podrá confundirlas tan fácilmente con estas otras formas. No obstante, han sucedido equivocaciones semejantes.

Para fines de demostración puede multiplicarse de tal manera la espiroqueta del agua, que denominaremos como *leptospira aquae*, que, por lo general, la podremos observar sin mucha dificultad al campo obscuro. Se encuentra por lo menos en la mitad de todas las aguas corrientes y estancadas del mundo exterior, como frecuentemente también, en el agua potable, especialmente en las aguas detenidas en las cañerías. Después de hacer su enriquecimiento, la vemos en el campo obscuro junto a espirilos, bacterias y protozoos; a veces en ejemplares únicos, con más frecuencia se encuentran en gran número en un campo de visión. Como métodos de multiplicación se usan el de Hindle (1925) y el de Vagedes (1935).

Siguiendo el método de Hindle, se colocan en varias placas de Petri 20 c. c. del agua que se desea examinar, la cual se mezcla con una cantidad, más o menos del tamaño de una arveja o guinda, de defecación humana esterilizada no ácida; enseguida se colocan las placas sobre la estufa de cultivo para su desarrollo. Después de 2-3 semanas los cultivos serán positivos con frecuencia.

El enriquecimiento según el método de Vagedes da aún mejores resultados. A 20 c. c. más o menos, del agua a examinar se agregan 10 - 20 granitos de "faez medicinalis puriss.", o algunas asas de cultivo puro de levadura de cerveza. Colocando las placas sobre la estufa de cultivo para su desarrollo, después de 1 a 2 semanas se obtendrá un gran enriquecimiento de leptospiras.

El cultivo de leptospiras no resulta difícil si se toma cuidado en observar ciertos detalles importantes. Es en absoluto necesario trabajar en condiciones de estricta esterilidad, porque difícilmente se conservan cultivos impuros; además, la siembra de los cultivos debe hacerse a tiempo y regularmente.

Como medio de cultivo para las leptospiras se usa agua de cañería esterilizada, a la que se agrega 10 % de suero de conejo también estéril. Para obtener un buen desarrollo, es importante que el agua empleada no sea ácida, sino que por lo menos tenga un pH de 7.0. En vez de suero de conejo, que es lo más apropiado, puede emplearse también suero humano o de caballo. La mezcla agua-suero, una vez preparada, se envasa en cantidades, más o menos, 1 ½ a 2 c. c. en tubos estériles y se inactiva durante media hora a 56 grados en tres días consecutivos. Después de ésto, los tubos quedan listos para la siembra.

Antes de entrar a describir el método del trabajo experimental con leptospiras patógenas, debemos llamar la atención sobre el peligro de infección que existe. Con frecuencia han sucedido infecciones en los laboratorios, que han tenido un desarrollo grave y que, no rara vez, han sido fatales. Las leptospiras pueden atravesar la piel con heridas, muchas veces invisibles, pero especial y fácilmente las mucosas. Por esto se recomienda usar para el trabajo guantes de goma, y evitar en lo posible que el material infeccioso llegue a la boca o a los ojos. Esto último ha sucedido frecuentemente, cuando durante la inoculación al cuy se ha desprendido la aguja de la jeringa y se ha rociado el material infeccioso.

Para aislar una cepa de leptospira-icterogenes, lo mejor es practicar inoculaciones de ratas corrientes a cuyes. Las ratas comunes vienen a ser la verdadera fuentes de infección para el hombre por el agua que ellas infectan por la orina. Estos animales se contagian entre sí, por lo cual, muchos de ellos pasan por la enfermedad de Weil. Los animales convalescientes conservan en sus riñones una cantidad de leptospiras, las que podemos comprobar generalmente en la cuarta parte de todas las ratas comunes adultas por el experimento animal o, con mayor dificultad por el cultivo y por el examen microscópico con fondo obscuro. Para aislar estas leptospiras en el cultivo, se sacrifican algunas ratas, se les extrae estérilmente los riñones y después

de emulsionarlos lo más estérilmente posible, se inyecta intraperitonealmente la emulsión de cada rata en uno o dos cuyes.

La preparación de la emulsión se efectúa en forma excelente haciendo pasar los riñones con ayuda del majadero de un mortero a través de un fino tejido de alambre. La emulsión que pasa mezclándola con suero fisiológico estéril, se inyecta por medio de agujas finas a los animales.

Para este experimento debe emplearse cobayos jóvenes, cuyo peso sea entre 150 a 250 gramos. Si la emulsión contiene leptospiras los animales mueren generalmente, pero no siempre, entre el quinto y séptimo día después de la inyección. No obstante, no se espera la muerte del animal, sino que, desde el segundo día de la inyección se examina el exudado peritoneal si contiene o no leptospiras. Para esto se hace un pequeño corte con una tijera en la piel exterior y esterilizada del animal en la región abdominal, se traspasa el resto de la pared con una pipeta-capilar estéril, y el exudado obtenido, libre de sangre, se coloca sobre un porta-objetos completamente limpio y sin rasguños, se cubre con un cubre-objetos y se observa al microscopio con fondo oscuro. A causa de que el exudado se coagula, aparecen luego de un corto tiempo las pseudo-espiroquetas que hemos ya descrito y que no deben ser consideradas como leptospiras. Si el examen resulta negativo, éste se repetirá más o menos al octavo día de la inyección.

Apenas se encuentren en el exudado peritoneal leptospiras en gran cantidad, se siembra de la sangre de éstos cuyes en tubos de cultivo. Esta siembra debe hacerse en lo posible antes del octavo día de la inyección, porque después de este tiempo, con frecuencia, ya no se encuentran leptospiras en la sangre a causa de la aparición de los anticuerpos. Es conveniente extraer la sangre del cuy por punción cardíaca y en condiciones de estricta esterilidad. La sangre obtenida se reparte en cantidades de más o menos 0.5 c. c. en algunos tubos de cultivo, que se colocarán para el desarrollo a una temperatura de 28 grados, lo mejor, sobre la estufa de cultivo, en un recipiente oscuro. En vez de la sangre puede sembrarse también una emulsión de hígado de un cuy sacrificado o recientemente muerto; pero los resultados con frecuencia son poco satisfactorios, ya que no siempre puede evitarse una infección bacteriana en el medio de cultivo. En cambio, los tubos sembrados con la sangre dan casi regularmente dentro de 3 o 4 semanas un abundante desarrollo de espiroquetas, desarrollo que, como todo cultivo de leptospiras, se mantiene claro, o presenta, cuando el desarrollo es muy poderoso, una ligera opalescencia. Para el examen se extrae con una pipeta capilar en punta y estéril, 1 a 2 gotas del cultivo y se observa al microscopio en la forma igual como ya se indicó para el examen peritoneal. Debemos llamar la atención sobre el peligro que existe en esta operación para el operador de poca práctica. Al aspirar del medio por la pipeta capilar debe evitarse cuidadosamente que ésta llegue a la boca; esto se hace fácilmente po-

sible en los primeros cultivos, porque a causa de los coagulos de fibrina que hay en el medio, se obstruye muchas veces la pipeta.

Para los pasajes-cultivos siguientes se continúa la siembra de uno de los primeros tubos con desarrollo abundante. Se siembra más o menos $\frac{1}{2}$ a 1 c. c. de cultivo por medio de una pipeta capilar en un nuevo tubo de cultivo, y así, una vez obtenido el desarrollo, se continúa resembrando regularmente en la misma forma. El desarrollo se consigue sobre la estufa. Por lo general, se presentan por algún tiempo dificultades en los cultivos. Los dos primeros pasajes in vitro resultan sin ninguna dificultad, pero después, las leptospiras crecen dificultosamente en algunos pasajes y es necesario una atención esmerada para que la cepa no se pierda. Muy conveniente resulta en estos casos, agregar a cada tubo, antes de sembrar, más o menos, 1 a 2 asas de cultivo vivo de levadura de cerveza (Zimmermann 1937). La levadura no se multiplica en el medio, y en cambio, favorece considerablemente el crecimiento de la leptospira, pudiendo así vencerse las dificultades en algunos pasajes. También en caso de un mal desarrollo posterior de la cepa, es de gran ventaja el uso de la levadura. Apenas la leptospira se haya acostumbrado al medio, se resiembrá regularmente con intervalos de 2 a 3 semanas, pero sólo se utilizarán cultivos con un buen desarrollo, como se ha indicado más arriba. Debo repetir que debe evitarse escrupulosamente cualquier infección mixta, ya que éstas casi siempre destruyen el cultivo.

Para establecer el diagnóstico experimental de la enfermedad de Weil en el hombre, debe tenerse presente, en primer lugar, que el agente de la enfermedad sólo puede comprobarse en la sangre del enfermo hasta el 6º., a lo sumo hasta el 8º. día de aparecida la enfermedad, mientras que más tarde puede encontrarse, durante un tiempo más o menos largo en la orina. No obstante, disponemos de métodos serológicos que permiten hacer el diagnóstico por el examen de la sangre, más o menos, desde el décimo día de la enfermedad en adelante, hasta frecuentemente durante muchos años.

Según nuestra experiencia, existen escasas posibilidades de poder encontrar el germen en la sangre del enfermo por examen directo al microscopio. Según Schüffner y Sieburgh se ha logrado comprobar el parásito por centrifugación con éxito en un 25 % de los casos; pero, esencial y desgraciadamente, debemos para ello recurrir siempre al experimento en el cobayo, lo que resulta algo demoroso. Para este experimento, se inyecta intraperitonealmente a dos cuyes jóvenes, más o menos de 150 a 250 gramos de peso, 3 a 5 c. c. de sangre desfibrinada de un paciente; además, puede también inyectarse intracardialmente o en la vena yugular, $\frac{1}{2}$ a 1 c. c. Muy conveniente es practicar estas inyecciones inmediatamente después de extraer la

sangre del paciente, pero la sangre también puede trasportarse, y realizar el experimento en un laboratorio adecuado.

En el experimento del diagnóstico es importante no esperar los síntomas evidentes del icterus, ni la muerte del animal con el cuadro de la enfermedad de Weil al quinto hasta séptimo día, sino que, a partir del 2º. día post inyección, se investigará si el exudado peritoneal contiene o no leptospiras. Como ya he dicho anteriormente, de esta manera puede establecer el diagnóstico lo más pronto posible; además los animales, a veces, sobreviven la infección, aunque en el exudado peritoneal ha podido comprarse por un corto tiempo el germen.

Si se desea comprobar el germen por el hemocultivo, lo que generalmente demora más tiempo que el experimento animal, se siembra en 2 c. c. de agua esterilizada de cañería del medio que se describe más arriba $\frac{1}{2}$ a 1 c. c. de sangre estéril de paciente, se deja a temperatura de 25 a 30 grados (sobre la estufa), y, a partir desde, más o menos, el sexto (6º.) día se empieza a controlar el cultivo al microscopio con fondo oscuro. Si se comprueba la existencia de leptospiras en el cultivo, éste podrá emplearse como cepa para los pasajes siguientes in vitro.

La comprobación de leptospiras en la orina del enfermo, que puede apreciarse en el curso ulterior de la enfermedad, es más difícil que el examen de sangre. La orina se centrifuga durante un tiempo, más o menos largo, en una buena centrifuga al mayor número de revoluciones; en seguida se observa el sedimento al microscopio con fondo oscuro, y después se inocula aun el centrifugado intraperitonealmente en un cuy. En el examen microscópico se verá a menudo, especialmente cuando la orina es ácida, sólo leptospiras degeneradas y deformes, muy difíciles de reconocer. El examen en los cuyes, que se practica al igual que el examen de la sangre, falla también en muchos casos, porque las leptospiras, o están igualmente muy dañadas, o, no son lo suficientemente virulentas.

Muchas veces se deseará mantener una cepa aislada del cuy y obtenida por inoculación de sangre humana. Ello se consigue, procediendo en igual forma como se hace para el aislamiento de una cepa de leptospira de las ratas.

Para la comprobación de la enfermedad en sus períodos tardíos, dan resultados más seguros, los métodos serológicos. Estos darán, por lo general, a partir del décimo (10) día de la afección, resultados positivos, y aún hasta después de años puede, mediante ellos, ser reconocida la enfermedad sobrevivida. Entre dichos métodos se considera en primer lugar la **reacción de aglutinación** según Schüffner y Mochtar. No entraré en detallar la técnica respectiva, ya que ella exige diferentes cepas del germen y porque ésta clase de investigaciones, en lo sucesivo, sólo podrán practicarse en laboratorios especializados. Para mayor orientación véase la literatura siguiente.

BIBLIOGRAFIA

- Uhlenhuth u. Fromme.—Weilsche Krankheit.—Handbuch der pathogenen Mikroorganismen. 3. Auflage 1928. Vol. VII, pág. 487.
- Zimmermann, E.—Ueber die experimentelle Diagnose und die Züchtung des Erregers des Weilschen Krankheit. Medizinische Klinik. 1936. Nr. 12.
- Zimmermann, E.—Ueber ein verbessertes Kulturverfahren der Spirochaeta icterogenes. Zentralblatt für Bakteriologie, 1. Abteilung. Originale, Vol. 136, 1937, pág. 280.
-

