

## Estudio sobre las bacterias ácido-resistentes aisladas de ratas grises

### SU RELACION CON LA LEPRO MURINA

(Con 1 lámina y 8 fotografías)

Por ENRIQUE SAVINO y CARLOS ACUÑA

---

El estudio de las bacterias ácido-resistentes de las ratas grises tiene un interés especial por su relación con la lepra murina, enfermedad que presenta cierta analogía con la afección humana. Este hecho explica la importancia de estos trabajos y este es uno de los motivos que hemos tenido al realizar este estudio, que nos fué sugerido por el doctor Alfredo Sordelli.

En este trabajo estudiamos tres cepas de bacterias ácido-resistentes que hemos aislado de ganglios linfáticos de ratas grises. Una de las cepas presenta particular interés por sus caracteres biológicos.

#### I. — ANTECEDENTES

La presencia de bacterias ácido-resistentes en ratas grises fué descubierta por Stefansky, en 1903. Stefansky, encargado del laboratorio del servicio antipestoso de la ciudad de Odesa (Rusia), observó que algunas ratas tenían ganglios linfáticos hipertrofiados sin ser pestosas. Continuando sus investigaciones Stefansky pudo demostrar que en estos roedores dichas lesiones eran causadas por microorganismos ácido-resistentes; la mayor parte de las bacterias ácido-resistentes estaban fagocitadas y dispuestas en forma muy semejante a la del *Myc. leprae* en las lesiones humanas. Además, en estas ratas parasitadas por bacterias ácido-resistentes, Stefansky descubrió dos formas lesionales: la ganglionar y la músculo-cutánea. La primera estaba caracterizada por la sola hipertrofia de los ganglios linfáticos, que eran duros y de color blanquecino. La forma músculo-cutánea se caracterizaba a su vez porque el animal presentaba manchas de alopecia, ulceraciones cutáneas, caquexia marcada y

lesiones musculares con hipertrofia ganglionar. Según Stefansky se trataba de una enfermedad muy difundida entre las ratas grises, pues el 4-5 % de los roedores examinados por él eran animales enfermos de lepra murina.

Rabinowitsch (1903), que tuvo oportunidad de presenciar en Odesa el hallazgo realizado por Stefansky, al regresar a Berlín examinó las ratas de esta ciudad y encontró que un 5 % de ellas también tenían lepra murina. Rabinowitsch trató de cultivar la bacteria ácido-resistente, agente etiológico de la lepra murina y transmitir experimentalmente la enfermedad a los animales de laboratorio, pero los resultados fueron negativos en ambos aspectos.

Casi simultáneamente con el hallazgo de Stefansky, Dean (1903), en Inglaterra, describió la misma enfermedad en la rata gris de su país. Dean estaba ocupado en la profilaxis de la peste en Elstree (Hertford), localidad vecina a Londres, y examinó una rata gris de aspecto caquético con lesiones cutáneas muy marcadas. Debajo de la piel se observaban nódulos de diferentes tamaños, que en algunos casos se abrían en la piel formando ulceraciones. Dean realizó el examen microscópico de estas lesiones y demostró que había en ellas grandes células que tenían el citoplasma ocupado por una gran cantidad de bacterias ácido-resistentes. Dean trató de cultivar dicho microorganismo, pero no tuvo éxito.

Estos hallazgos fueron más tarde confirmados por otros autores en diferentes partes. Así por ejemplo, Tidswell (1904), en Sydney (Australia); Bull (1907), en la India; Wherry y Walker (1908), en los Estados Unidos de Norteamérica; Mezinescu y Alexandrescu (1908), en Rumania; en Japón por Honda (1908), Kitasato (1909), Kitasato y Sakai (1909), Iitoyo y Sakai (1909), Sakai (1910), Kawamura (1914), Uchida (1921) y Ohtawara y Ichira (1921); en París, por Marchoux y Sorel (1912); en Hawai, por Currie y Hollmann (1911), Leboeuf (1913), en Nueva Caledonia; McCoy (1913), en California; Ischiwara (1913), en Corea; Acevedo (1913), en Brasil; Leger (1919), en Guayanas; y Lampe y Moor (1935), en las Indias Holandesas.

*Etiología de la lepra murina.* — El agente etiológico de la lepra murina es una bacteria ácido-resistente perteneciente al género *Mycobacterium*. Muchos autores no consiguieron cultivarlo y entre ellos debemos citar a los investigadores siguientes: Rabinowitsch (1903), Dean (1903), Mezinescu (1908), Kitasato (1909), Ischiwara (1913), Marchoux (1934), Gerbinis (1933) y Lowe (1934).

Otro grupo de autores pretenden haberlo cultivado, y entre ellos citaremos a Hollmann (1912); Zinsser y Carey (1912); Bayon

(1914); Uchida (1923); Otahara (1931); Ota *et al.* (1932); Cilenti y North (1931); Walker y Sweeney (1935); Asami (1932); Salle (1934); y Gavrilov *et al.* (1938).

Entre los autores que pretenden haber cultivado al agente etiológico de la lepra murina nos ocuparemos especialmente de aquellos que sostienen haber conseguido reproducir la enfermedad experimental en diferentes animales, mediante la inoculación de dichos cultivos.

Bayon (1914), sostiene que cultivó el microorganismo de la lepra murina en agar-extracto de pescado y que por inoculación del cultivo a la rata consiguió infectar estos animales.

Asami (1932), sembró en el medio de Löwenstein modificado por Sumiyoshi el material de 17 ratas leprosas y aisló 12 cepas de bacterias ácido-resistentes. De 41 ratas grises inoculadas con estos cultivos 23 presentaron lesiones marcadas de los ganglios linfáticos, acompañadas en algunos casos por lesiones cutáneas. Los conejos y caviás también eran sensibles a la inoculación de estos cultivos.

Ota *et al.* (1932), que sembraron material de ganglio de ratas leprosas en los medios de Petraghani y de Petroff, obtuvieron desarrollo positivo. Los autores citados reconocieron la presencia de dos tipos de bacterias que por los caracteres culturales denominaron *Mycobacterium leprae* var. *vitellinum* al uno y al otro var. *cremeun*. Inocularon ratas grises con estos desarrollos y los animales presentaron después de varios meses ganglios hipertrofiados, que al examen microscópico revelaron la presencia de macrófagos con una gran cantidad de bacterias ácido-resistentes.

*Sensibilidad de los animales a la lepra murina.*— La sensibilidad de la rata blanca a la lepra murina fué demostrada por Sorel (1912); Muir y Henderson (1928) y por otros autores. Marchoux, *et al.* (1935), encontraron que la inoculación de las bacterias de la lepra murina en la conjuntiva de la rata blanca provoca una infección sin chancro de inoculación.

Sellards y Pinkerton (1936), sostienen que algunas razas de ratones blancos son sensibles a la lepra murina y que la inoculación intracerebral al mono, conejos y ratones blancos producía lesiones leprosas en la meninges.

Muir y Henderson (1928), afirman que los monos, conejos y hamster no son sensibles a la lepra murina. Watanabe (1934), tampoco consiguió infectar caviás, monos y conejos. Sin embargo Marchoux (1939), hizo notar que la rata blanca, el ratón blanco y el hamster son sensibles a la lepra murina.

*Fenómenos de inmunidad en los animales inoculados con lepra murina.* — Burnet (1938), encontró que las ratas blancas inoculadas con lepra murina no presentaban el fenómeno de Koch ni manifestaciones de sensibilidad cutánea.

Marchoux y Chorine (1938), también observaron que el fenómeno de Koch no se produce en ratas leprosas. Según ellos la nueva inoculación del leproma da origen a un nuevo foco de infección.

*Caracteres del microorganismo causal de la lepra murina.* — Cowdry y Heimburger (1935), estudiaron la morfología de los microorganismos agentes de la tuberculosis y de la lepra humana y murina, llegando a la conclusión de que eran muy semejantes en sus caracteres morfológicos.

La bacteria de la lepra murina es sensible al calor y muere por calentamiento de 15 minutos a 60° C. (Marchoux, 1934). No pierde la vitalidad por tratamiento con ácido sulfúrico al 5 % (Marchoux y Chorine, 1932) y en glicerina al 40 % conserva su virulencia hasta 3 años después (Marchoux 1931, y Chorine, 1934).

*Epidemiología de la lepra murina.* — Es una enfermedad de la rata gris y su frecuencia es muy variable. De las 3 especies de ratas grises la que más comúnmente presenta esta enfermedad es el *Rattus norvegicus* (Leger 1919, y Marchoux 1934). Raramente se presenta en el *Rattus rattus* y *R. alexandrinus*.

Marchoux (1934), sostiene que no hay certeza que la enfermedad pueda ser transmitida a la rata por pulgas, piojos u otros insectos y considera como más probable que se adquiriera por la piel, donde las heridas cutáneas facilitarían la entrada del microorganismo. No existe transmisión congénita y tanto los animales machos como las hembras enfermos de lepra murina se esterilizan (Marchoux, 1934). Por otra parte no existe ninguna predilección por el sexo, pues los animales machos y hembras se enferman en la misma proporción (McCoy, 1913).

La forma ganglionar es la más frecuentemente observada en las ratas grises y la enfermedad se manifiesta generalmente en los animales adultos; es muy rara en los animales jóvenes (McCoy, 1913; Leger, 1919; y Lampe y Moor, 1936).

*Patología de la lepra murina.* — Como hemos dicho anteriormente, Stefansky (1903), describió en la rata gris una forma ganglionar y otra músculo-cutánea.

Según Marchoux (1939), la enfermedad se localiza primero en los ganglios de la rata y luego se generaliza formando lepromas nodulares en el tejido celular subcutáneo, placas de alopecia, ulcera-

ciones cutáneas degeneración del tejido muscular, ceguera e invasión de las vísceras.

Para Lowe (1934), la lepra murina sería una enfermedad que se localiza en las células del aparato retículo-endotelial.

Marchoux y Sorel (1912), y Lowe (1937), sostienen que en la lepra murina no hay los « globi » de la lepra humana y esto sería uno de los caracteres diferenciales entre la lepra murina y humana.

Cowdry y Ravold (1938), realizaron un estudio sobre la histopatología de la lepra murina y observaron que las bacterias tienden a tomar, en el citoplasma de las células que las fagocitan, una disposición radial muy marcada que designaron con el nombre de « roseta ». Estas « rosetas » son esféricas y tienen un tamaño que varían entre 7 y 35 micrones. Las « rosetas » se encuentran preferentemente en la perifería del nódulo leproso y las células que las contienen suelen tener 3, 6 o más núcleos; no hay en ellas signos de mitosis y parecen originarse por fusión de los monocitos. El enorme número de bacterias que contienen las células hace suponer a los autores citados que las bacterias se multiplican dentro de las mismas células que parasitan.

## II. — INVESTIGACIONES PERSONALES

El material utilizado en la realización de este trabajo se tomó de las ratas grises que diariamente llegan a la Sección Peste para ser examinadas.

Con el objeto de demostrar la existencia de lepra murina y con la participación de los doctores A. Aldao y B. Anchezar, a quienes agradecemos la colaboración prestada, hemos examinado 1.112 ratas grises investigando bacterias ácido-resistentes en los ganglios y en el tejido celular subcutáneo.

Las 1.112 ratas grises estudiadas se distribuían en las especies siguientes:

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| <i>R. norvegicus</i> .....   | 682 |
| <i>R. rattus</i> .....       | 205 |
| <i>R. alexandrinus</i> ..... | 225 |

Sólo en 14 ratas hemos observado bacterias ácido-resistentes en el ganglio inguinal. En 2 casos las bacterias se agrupaban presentando el aspecto característico de las « rosetas » propias de la lepra murina, mientras que en las 12 ratas restantes los microorganismos estaban libres, dispersos y no adoptaban ninguna disposición particular.

En ningún caso hemos podido demostrar la presencia de bacterias ácido-resistentes en el tejido celular subcutáneo de aquellas ratas que por su aspecto nos hicieron pensar que podrían ser ratas afectadas de la forma cutánea de la lepra murina.

Distribuidas por especie zoológica, las ratas que tenían bacterias ácido-resistentes, fueron:

- 10 *R. norvegicus*;
- 1 *R. rattus*;
- 3 *R. alexandrinus*.

Las dos ratas que tenían « rosetas » en sus ganglios inguinales pertenecían a la especie *R. norvegicus*.

De los 14 casos que tenían bacterias ácido-resistentes en sus ganglios se realizó siembra de este material en 13 (por razones ajenas a nuestra voluntad no se realizó la siembra del material de uno de los ganglios con « rosetas ») y el resultado fué positivo en 3 ocasiones. El material utilizado para la siembra fué tratado por ácido sulfúrico al 5 % y la siembra se realizó en los medios de Löwenstein y Petraghani con glicerina. En uno de los casos de siembra positiva ésta fué realizada con el material de una rata que tenía « rosetas » en su ganglio inguinal, mientras en los otros dos, también positivos, el cultivo se hizo con ganglios donde las bacterias ácido-resistentes estaban libres, dispersas y sin ninguna tendencia a agruparse en forma especial. Las tres cepas de bacterias ácido-resistentes, aisladas por nosotros provenían en todos los casos de material obtenido de *R. norvegicus*, cazados en los terrenos adyacentes a la estación Ingeniero Brian del Ferrocarril General Buenos Aires. Estas cepas las hemos designado con los nombres « R<sub>1</sub> » « R<sub>3</sub> » y « L. M. », esta última es la aislada del ganglio en que se observó la disposición en « roseta ».

*Caracteres de la cepa « R<sub>1</sub> ».* — La cepa « R<sub>1</sub> » fué aislada del ganglio inguinal de un *R. norvegicus* cazado el 27 de abril de 1938, en los terrenos pertenecientes al Ferrocarril General Buenos Aires, vecinos a la estación Ingeniero Brian, mediante siembras en los medios de Löwenstein y Petraghani con glicerina. El ganglio de la rata era grande, duro, de color blanquecino y el examen microscópico reveló la presencia de bacterias ácido-resistentes.

Una porción del ganglio fué utilizada para las siembras y la otra se inoculó a ratas blancas jóvenes. El resultado de las siembras fué positivo a los 8 días de incubación a 37° C. y las ratas presentaron un nódulo en el sitio de la inoculación que luego se

abrió espontáneamente en la piel para después cicatrizar; los animales no presentaron ninguna otra particularidad.

La bacteria aislada es de bastones cortos, ácido-resistente e inmóvil, no forma indol, reduce los nitratos a nitritos, no modifica la leche tornasolada, no licúa la gelatina y no fermenta sacarosa, lactosa, glucosa, xilosa, inosita, manita, ramnosa, dulcita, salicina, sorbita, dextrina, inulina, glicerina ni almidón.

Esta cepa se caracteriza por la facilidad con que crece en el caldo y en el agar nutritivo. No enturbia el caldo nutritivo y crece formando una película delgada. En el medio de Sauton forma un velo muy tenue y en caldo glicerinado el velo es algo más grueso.

En el medio de Löwenstein el desarrollo es abundante, toma un color amarillento de superficie seca, rugosa y opaca. En el medio de Petraghani con glicerina el cultivo es muy semejante al anterior, pero en Petraghani con cera el desarrollo es también abundante, de color amarillento y de superficie húmeda, rugosa y brillante.

El desarrollo es muy pobre en papa con glicerina al 5 %.

El poder patógeno de la cepa «R<sub>1</sub>» se ensayó en los siguientes animales:

*Ratón blanco.* — La inoculación de 1 mgr. de bacterias, por vía intraperitoneal, provoca la muerte de la mayor parte de los animales en un tiempo que varía desde 5 días hasta varios meses. El examen de los animales muertos reveló en muchos casos la presencia de bacterias ácido-resistentes en el bazo y en el hígado. En ningún caso estas bacterias tendían a disponerse en «rosetas» y la mayor parte de los microorganismos estaban libres. No se pudo observar bacterias ácido-resistentes en ganglios, pulmón y sangre. La inoculación de 1 mgr. de bacterias ácido-resistentes por vía subcutánea, al ratón blanco, dió lugar a la formación de un nódulo que luego se abrió en la piel para evacuar su contenido caseoso. Los animales no presentaron ninguna otra particularidad.

*Rata blanca.* — La rata blanca es bastante resistente a la inoculación de 1 mgr. de bacterias por vía venosa, intraperitoneal o subcutánea.

La cepa «R<sub>1</sub>» tampoco es patógena para el cavia, gallina, conejo y paloma cuando se inocula 1 mgr. de bacterias por vía venosa o subcutánea.

*Caracteres de la cepa «R<sub>3</sub>».* — La cepa «R<sub>3</sub>» fué aislada del ganglio inguinal de un *R. norvegicus* cazado en los terrenos vecinos a la estación Ingeniero Brian el 23 de marzo de 1938. Una

porción del ganglio fué inoculada por vía subcutánea a dos ratas blancas y otra parte fué tratada por ácido sulfúrico al 5 % y luego sembrada en los medios de Löwenstein y Petragnani con glicerina.

Las inoculaciones de las ratas dieron resultado negativo y los cultivos en el medio de Petragnani con glicerina fueron positivos el 18 de abril. El cultivo realizado en el medio de Löwenstein fué negativo.

La bacteria aislada es ácido-resistente, inmóvil, no produce indol, no modifica la leche tornasolada y reduce los nitratos a nitritos. No licúa la gelatina y no fermenta los siguientes hidratos de carbono: glucosa, lactosa, sacarosa, manita, xilosa, inosita, sorbita, trealosa, salicina, dulcita, ramnosa, almidón, inulina y dextrina.

Crece en caldo y en agar nutritivo. El desarrollo en caldo nutritivo se caracteriza por formar un velo en la superficie, que tiene tendencia a subir por las paredes del tubo. En el medio de Sauton crece formando un velo delgado. En papa glicerinada al 5 % después de 15 días de incubación se tiene un cultivo abundante de color gris amarillento y de superficie rugosa, seca y opaca. En papa biliada el crecimiento es menos abundante y después de 30 días de incubación observamos algunas colonias de color grisáceo y de superficie rugosa.

Sembrado en el medio de Löwenstein, a los 5 días el desarrollo es abundante, de color blanquecino y de superficie húmeda, brillante y lisa. En Petragnani con glicerina el crecimiento es rápido, abundante, con un tinte ligeramente violáceo, de superficie rugosa, seca y opaca. En Petragnani con cera el desarrollo presenta un color amarillento, de superficie brillante, húmeda y rugosa.

*El poder patógeno* se determinó en los siguientes animales:

*Ratón blanco.*— El ratón blanco muere si se inocula con 1 a 10 mgrs. de bacterias, por vía venosa o intraperitoneal. Los animales inoculados por vía venosa suelen morir dentro de las dos semanas; mientras que los inoculados por vía intraperitoneal mueren en un período de tiempo que varía de 15 días a 3 meses. Los animales muertos después inoculados por vía venosa presentaron el hígado y bazo aumentados de tamaño y el examen microscópico reveló la presencia de bacterias ácido-resistentes en dichos órganos. Los animales inoculados por vía intraperitoneal murieron con una peritonitis fibrinosa, adhesiva y nódulos caseosos en peritoneo; en algunas ocasiones el hígado estaba aumentado de tamaño. El examen microscópico demostró la existencia de bacterias ácido-resistentes en hígado, bazo, riñón y pulmón.



*Rata blanca.* — La inoculación de 10 mgrs. de bacterias por vía intraperitoneal provocó la muerte de los animales, aproximadamente, después de 10 días. El examen de los animales muertos reveló aumento del tamaño del hígado y nódulos en el bazo, que en algunos casos alcanzaban el tamaño de la cabeza de un alfiler. Por el examen microscópico observamos bacterias ácido-resistentes en hígado, bazo, riñón y pulmón.

La inoculación de 10 mgrs. de bacterias por vía subcutánea no provoca la muerte de las ratas blancas. Sólo se observó la formación de un nódulo en el sitio de inoculación con formación de un pus caseoso, abundante en bacterias ácido-resistentes, que se eliminó a través de la piel. En un caso hemos sacrificado a algunos de los animales inoculados a los 15 días de la inyección y sólo observamos algunas bacterias ácido-resistentes en el bazo.

*Rata gris.* — La rata gris joven (*R. rattus*) es también un animal sensible. La inoculación de 1 mgr. de estas bacterias, por vía intraperitoneal, provocó la muerte de los animales después de 8 días, sin lesiones macroscópicas manifiestas, pero con bacterias ácido-resistentes en el hígado, bazo y riñón. Si la inoculación de las bacterias se hace por vía subcutánea aparece un nódulo en el sitio de inoculación, con formación de un pus caseoso que contiene bacterias ácido-resistentes. La mayor parte de los animales inoculados por vía subcutánea murieron después de 3 semanas de inoculados y por el examen microscópico observamos bacterias ácido-resistentes en el hígado, bazo y ganglio inguinal correspondiente a la región del sitio de inoculación.

*Otros animales.* — Cavia, conejos, palomas y gallinas, resisten a la inoculación de 10 mgrs. de bacterias inoculadas por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa.

La cepa «R<sub>3</sub>», al igual que la anterior, se caracterizaba, porque en las preparaciones microscópicas de las vísceras de los animales muertos, las bacterias estaban dispersas y no tenían tendencia a agruparse en alguna forma especial.

*Caracteres de la cepa «L. M.».* — La cepa «L. M.», fué aislada del ganglio inguinal de una rata gris (*R. norvegicus*) cazada el 18 de abril de 1938 en los terrenos vecinos a la estación Ingeniero Brian. El examen microscópico del ganglio reveló la presencia de abundantes bacterias ácido-resistentes, que en su mayor parte estaban fagocitadas y dispuestas a manera de «rosetas» en el citoplasma de las células que las contenían. El ganglio de la rata

estaba aumentado de tamaño, la consistencia era dura y tenía un color blanquecino.

Una porción del ganglio fué inoculada a dos ratas blancas por vía subcutánea y el resto, una vez tratada por ácido sulfúrico al 5 %, se sembró en los medios de Löwenstein y Petragnani con glicerina.

Las ratas inoculadas con el material de ganglio fueron observadas durante varios meses y no presentaron nada de particular. En cambio, los cultivos, realizados en los medios arriba indicados, fueron francamente positivos al mes de incubados en estufa a 37° C.

El microorganismo aislado es una bacteria ácido-resistente y presenta la forma de bastones cortos y de cocobacilos. No desarrolla en caldo ni en agar nutritivo. Desarrolla lentamente en los medios de Löwenstein, Petragnani con glicerina, Petragnani con cera, papas glicerizadas, en el medio de Dorset y en agar glicerizado. En los medios de Löwenstein y de Petragnani, al mes de incubación, el desarrollo es abundante, y el cultivo cobra un color amarillento, de superficie lisa, húmeda y brillante. En el medio de Sauton primero forma una película delgada (que a las dos semanas de inoculación adquiere mayor espesor) de superficie rugosa y el desarrollo tiene tendencia a subir por las paredes del frasco.

*El poder patógeno* de la cepa «L. M.» fué estudiada en los siguientes animales:

*Ratón blanco.* — La incubación de 1 mgr. de bacterias, por vía venosa provocó la muerte de los animales en un lapso de tiempo que varió de 8 días a 1 mes. Los animales muertos tenían esplenomegalia y sin ninguna otra particularidad. El examen microscópico de las vísceras reveló abundantes bacterias ácido-resistentes en hígado, bazo y pulmón. La mayor parte de las bacterias estaban fagocitadas y formaban «rosetas».

*Rata blanca.* — Hemos inoculado ratas blancas con 1 mgr. de bacterias por vía peritoneal y los animales murieron dentro de los 8 - 30 días de inoculados. La observación microscópica de las vísceras no demostró nada anormal, pero el examen microscópico permitió observar abundantes bacterias ácido-resistentes, libres y en «rosetas», en bazo, hígado y riñón.

La inoculación de 1 mgr. de bacterias por vía subcutánea, provocó la formación de un nódulo en el sitio de inoculación que a los dos meses, aproximadamente, se abrió espontáneamente en la piel para dar salida a un pus caseoso que contenía regular cantidad de bacterias ácido-resistentes. Algunos animales murieron a los dos meses

de inoculados y la mayor parte sobrevivieron a la inoculación. Los animales que murieron no presentaron al examen microscópico más que un ligero aumento ganglionar en la región inguinal correspondiente al sitio de inoculación. Por el examen microscópico hemos podido observar bacterias ácido-resistentes, libres y en « rosetas », en el ganglio hipertrofiado y algunas veces también en el bazo.

*Rata gris.* — La rata gris adulta es poco sensible a la inoculación intraperitoneal o subcutánea de esta bacteria.

Nosotros hemos inoculado 8 ratas grises adultas (*R. norvegicus*) con 1 mgr. de cultivo de la cepa « L. M. » desarrollada en el medio de Petraghani con glicerina. Tres ratas fueron inoculadas por vía subcutánea y las restantes por vía intraperitoneal. Las ratas inoculadas por vía subcutánea presentaron un nódulo en el lugar de inoculación, que a los 6 meses se reblandeció y dió lugar a la formación de un pus caseoso con abundantes bacterias ácido-resistentes, que en su mayor parte estaban fagocitadas y se agrupaban en forma de « rosetas ».

Las ratas adultas inoculadas por vía intraperitoneal, después de seis meses presentaron áreas de alopecia y ulceraciones cutáneas, pero no se pudo demostrar la existencia de bacterias ácido-resistentes en la piel, y sacrificados los animales sólo pudimos observar algunas « rosetas » en el bazo y en el hígado del animal.

La rata gris joven es muy sensible a la inoculación de esta bacteria. Nosotros hemos inyectado 10 ratas grises muy jóvenes con 1 mgr. de bacterias desarrolladas en el medio de Petraghani con glicerina. Cinco ratas fueron inoculadas por vía intraperitoneal e igual número por vía subcutánea. Al mes sólo sobrevivió un animal de cada grupo. Los animales inoculados por vía subcutánea tenían hipertrofiado el ganglio inguinal perteneciente a la región del sitio de inyección, con gran abundancia de bacterias ácido-resistentes, las cuales colmaban por completo a las células que lo contenían. También había bacterias ácido-resistentes en bazo e hígado. Los animales muertos que habían sido inoculados por vía intraperitoneal tenían abundantes « rosetas » en el hígado y en el bazo.

Los dos animales sobrevivientes no presentaron aparentemente nada de particular y fueron sacrificados a los seis meses de inoculados. El animal que fué inoculado por vía subcutánea tenía el ganglio inguinal correspondiente a la región de inoculación, ligeramente aumentado de tamaño, era blanco y de consistencia dura; el examen microscópico reveló abundantes bacterias, agrupadas en « rosetas » en dicho ganglio y en el bazo.

El animal que había sido inoculado por vía intraperitoneal, y que

fué sacrificado a los seis meses, tenía el peritoneo sembrado de pequeños nódulos del tamaño de la cabeza de un alfiler y el examen microscópico de dichos nódulos permitió observar abundantes « rosetas ». También en el hígado y bazo del roedor habían « rosetas ».

*Cavia.* — El cavia joven es también un animal sensible a la inoculación de esta bacteria. Nosotros hemos inoculado cavia, que pesaban aproximadamente 180 gramos, con 1 mgr. de bacterias desarrolladas en el medio de Löwenstein. Quince animales fueron inoculados por vía subcutánea e igual número por vía intraperitoneal. Los animales empezaron a morir a la semana de inoculados y al mes habían muerto todos los inoculados por vía intraperitoneal y sólo sobrevivían tres de los inoculados por vía subcutánea.

Los animales muertos e inoculados por vía subcutánea presentaron el ganglio inguinal ligeramente aumentado de tamaño, con bacterias ácido-resistentes, libres o en « rosetas » en dicho ganglio y en el bazo. Los animales inoculados por vía intraperitoneal tenían bacterias ácido-resistentes en hígado, bazo, pulmón, riñón y en los ganglios mesentéricos, retroesternal, sublingual, inguinal y tráqueobrónquicos.

*Conejo.* — El conejo es un animal muy sensible y muere en 4 a 8 días cuando se inocula con 10 mgrs. de bacterias por vía venosa y en un tiempo aproximado de 15 días cuando se inocula 1 mgr. de bacterias por esa misma vía. Los animales mueren con hígado y bazo congestivos y muy aumentados de tamaño; el examen microscópico nos permitió observar abundantes bacterias ácido-resistentes, libres y en « rosetas » en hígado y bazo, y en menor número en riñón y pulmón (fot. 1, 2 y 3).

Este animal no es sensible a la inoculación de 1 mgr. de bacterias por vía subcutánea.

*Gallina.* — La cepa « L. M. » es patógena para la gallina en la dosis de 1 mgr. por vía venosa y el animal muere, en estado caquético, aproximadamente al mes de inoculación. Al examinar los animales observamos que el hígado y el bazo estaban muy aumentados de tamaño y la observación microscópica reveló que había abundantes bacterias ácido-resistentes, libres y en « rosetas », en los dos órganos arriba citados y muy escasos en riñón y pulmón (fot. 4 y 5).

Por vía subcutánea la acción patógena es menor y sólo uno de dos animales murió a los 9 meses de inoculado con 1 mgr. de bacterias. El animal tenía una marcada hepato y esplenomegalia y toda la superficie del hígado estaba cubierta de pequeños nódulos blanco-

amarillentos del tamaño de la cabeza de un alfiler. El examen microscópico nos permitió observar abundantes bacterias ácido-resistentes sólo en el hígado y en el bazo.

*Paloma.*— Este animal muere en un tiempo que varía de 1 a 4 meses cuando es inoculado por 1 mgr. de bacterias por vía peritoneal o venosa. Los animales mueren en caquexia y nos llamó la atención la marcada esplenomegalia con abundantes bacterias ácido-resistentes en la viscera (fot. 6, 7 y 8).

*Cultivo de las vísceras de los animales muertos e inoculados con la cepa «L. M.».*— Al terminar nuestro relato sobre el poder patógeno de la cepa «L. M.» debemos decir que los cultivos realizados con los órganos que tenían bacterias ácido-resistentes, cuya presencia demostró el examen microscópico, dieron resultado positivo en los medios de Löwenstein y de Petragnani con glicerina.

*Fenómenos de inmunidad en cavia inoculados con las cepas «R<sub>1</sub>» «R<sub>3</sub>» y «L. M.».* *Relación con el «Mycobacterium tuberculosis var. hominis».*

1º *Fenómeno de Koch.*— Los cavia fueron sensibilizados por la inoculación subcutánea de 1 mgr. de bacterias por vía subcutánea. Después de seis semanas, una vez sensibilizados, los animales volvieron a inocularse con la bacteria respectiva de la cual se quería demostrar el fenómeno de Koch; en esta segunda vez se inoculó 1 mgr. de bacterias, por vía subcutánea, en la región inguinal opuesta al lugar de inoculación de las bacterias sensibilizantes.

TABLA I  
Resultado del fenómeno de Koch

| Bacterias sensibilizantes | Bacterias desencadenantes | Resultado del fenómeno de Koch |
|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Myc. tubere.              | Myc. tubere.              | Positivo                       |
| Myc. tubere.              | «L. M.»                   | Negativo                       |
| Myc. tubere.              | «R <sub>1</sub> »         | Negativo                       |
| Myc. tubere.              | «R <sub>3</sub> »         | Negativo                       |
| «L. M.»                   | Myc. tubere.              | Negativo                       |
| «L. M.»                   | «L. M.»                   | Positivo                       |
| «R <sub>1</sub> »         | Myc. tubere.              | Negativo                       |
| «R <sub>1</sub> »         | «R <sub>1</sub> »         | Negativo                       |
| «R <sub>3</sub> »         | Myc. tubere.              | Negativo                       |
| «R <sub>3</sub> »         | «R <sub>3</sub> »         | Negativo                       |
| —                         | Myc. tubere.              | Negativo                       |
| —                         | «L. M.»                   | Negativo                       |
| —                         | «R <sub>1</sub> »         | Negativo                       |
| —                         | «R <sub>3</sub> »         | Negativo                       |

Los resultados obtenidos están expresados en la tabla 1, y de su examen deducimos que de las tres cepas de bacterias ácido-resistentes aisladas de ratas grises, sólo la denominada «L. M.» es capaz de provocar en el cavia el fenómeno de Koch, y únicamente para la cepa homónima. En efecto, a los dos días de inoculado con la inyección desencadenante el animal presentó edema en el lugar de inoculación con infarto ganglionar. Después de 8 días el contenido del ganglio estaba reblandecido, el edema de la pata era muy marcado y el pus se evacuó espontáneamente al exterior; el examen microscópico del mismo permitió la observación de abundantes «rosetas».

Nuestros resultados nos permitieron, además, demostrar que en cuanto al fenómeno de Koch, no existe ninguna relación entre la cepa «L. M.» y el *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*.

2º *Fenómenos de sensibilidad cutánea.* — Los cavia fueron sensibilizados en la forma indicada al hablar del fenómeno de Koch. Después de 6 semanas se inoculó en el dermis el antígeno que se quería ensayar. Como testigos hemos tomado cavia inoculadas con *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*, y como antígeno hemos empleado tuberculina «P. P. D.» y un derivado proteico preparado con la cepa «L. M.» siguiendo el método descrito por Seibert para la obtención de la tuberculina «P. P. D.». De estas proteínas purificadas empezamos por preparar una solución de 1 mgr. por ml. y de ellas preparamos a su vez las siguientes diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ . De estas diluciones hemos inoculado 0.1 ml. por vía intracutánea y leímos sus resultados a las 24 y 48 horas. Un lado del animal fué inoculado con las diferentes diluciones de la tuberculina «P. P. D.» y el otro con el derivado proteico de la cepa «L. M.». Los resultados obtenidos están consignados en la tabla 2.

TABLE 2  
Resultados de las reacciones cutáneas

| Antígeno<br>inoculado<br>intracutáneo | Resultados de las reacciones cutáneas                                       |  |  |  |
|---------------------------------------|---|--|--|--|
|                                       | Caviae sensibilizadas con<br><i>Myc. tuberculosis</i> var. <i>hominis</i> . |  | Caviae sensibilizadas con<br>« L. M. » |  |
|                                       | Tuberculina<br>« P. P. D. »   | Derivado proteico<br>purificado<br>« L. M. » | Tuberculina<br>« P. P. D. »            | Derivado proteico<br>purificado<br>« L. M. » |
| 10 γ                                  | Positivo  | Negativo                                     | Negativo                               | Positivo                                     |
| 1 γ                                   | Positivo  | Negativo                                     | Negativo                               | Positivo                                     |
| 0.1 γ                                 | Positivo  | Negativo                                     | Negativo                               | Negativo                                     |
| 0.01 γ                                | Negativo  | Negativo                                     | Negativo                               | Negativo                                     |
| 0.001 γ                               | Negativo  | Negativo                                     | Negativo                               | Negativo                                     |

Del resultado de las pruebas cutáneas nosotros deducimos que desde ese punto de vista la cepa « L. M. » no presenta ninguna relación antigénica con el *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*.

### III. — RESUMEN

Entre las enfermedades infecciosas del hombre y de los animales existe un grupo muy importante, denominado micobacteriosis, que son originadas por bacterias pertenecientes al género *Mycobacterium*. Las micobacteriosis más importantes del hombre son la tuberculosis y la lepra. Ahora bien, la rata gris suele presentar una enfermedad debida a una bacteria del género *Mycobacterium*, que se conoce con el nombre de lepra murina y tiene un interés muy especial por las analogías que presenta con la enfermedad del hombre.

La lepra murina es una enfermedad de evolución larga, lleva a los animales a la caquexia, ataca primero los ganglios, más tarde invade la piel, los músculos y a veces también las vísceras. El agente etiológico de esta enfermedad es una bacteria ácido-resistente, que tiene la particularidad de disponerse de una forma especial dentro de las células que la fagocitan, agrupación a la cual se ha dado el nombre de « roseta » y que presenta bastante analogía con el « globi » de la lepra humana.

La mayor parte de los autores sostienen que el microorganismo agente etiológico de la lepra murina no se desarrolla en los medios de cultivo usados hasta el presente. Sin embargo, algunos autores

pretenden haber cultivado esta bacteria y con estos cultivos dicen que han llegado a reproducir experimentalmente la enfermedad.

Nosotros hemos examinado 1.112 ratas grises y en dos casos hemos observado en el ganglio inguinal de estos roedores bacterias ácido-resistentes fagocitadas y dispuestas en forma de «rosetas». La siembra realizada con el material del ganglio de una de estas ratas fué positivo en los medios de Löwenstein y de Petragnani. La cepa así obtenida la hemos denominado «L. M.» y es una bacteria ácido-resistente que por sus caracteres pertenece al género *Mycobacterium*. Es una bacteria que sólo desarrolla en determinados medios de cultivos y es patógena para el conejo, gallina, paloma, rata gris joven, cavia, ratón y rata blanca.

La cepa «L. M.» es capaz de provocar en el cavia reacciones de inmunidad que pueden ser revelables por el fenómeno de Koch y por las reacciones cutáneas. Estas reacciones de inmunidad de la cepa «L. M.» nos induce a pensar que no existe relación antigénica entre esta cepa y el *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis*.

Nosotros no nos inclinamos a creer que la cepa que hemos aislado y que hemos denominado «L. M.» sea el agente etiológico de la lepra murina. Basamos nuestra creencia en el hecho que es una bacteria que se desarrolla en algunos medios de cultivo y por los fenómenos de inmunidad que es capaz de provocar en el cavia. Estos datos, unidos a la virulencia particular que tiene para el conejo, paloma y gallina, están en contradicción con los caracteres que la mayor parte de los autores asignan al agente etiológico de la lepra murina.

Sin embargo, la cepa «L. M.» presenta cierta similitud con el *Mycobacterium* agente etiológico de la lepra murina, puesto que es una bacteria patógena para algunos animales y provoca lesiones que tienen ciertas analogías con los de la lepra murina.

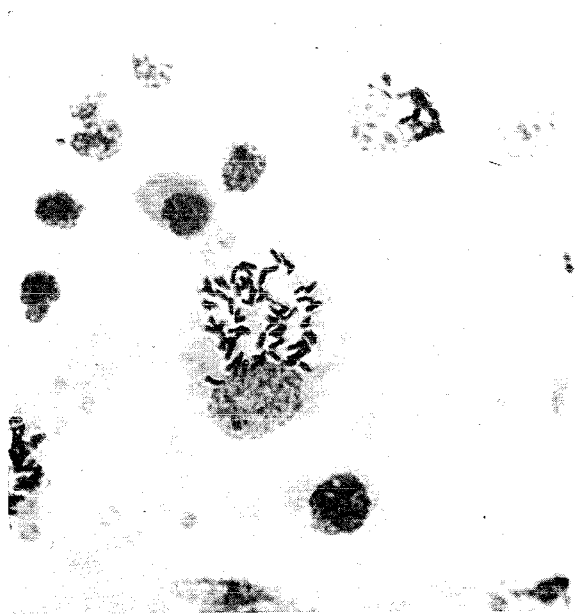
Estos hechos y los datos consignados en la literatura nos podrían hacer pensar en la posibilidad que *Mycobacterium* de distintas especies sean capaces de originar en la rata gris una enfermedad natural con un cuadro anatómico muy semejante al de la lepra murina.

#### IV. — BIBLIOGRAFIA

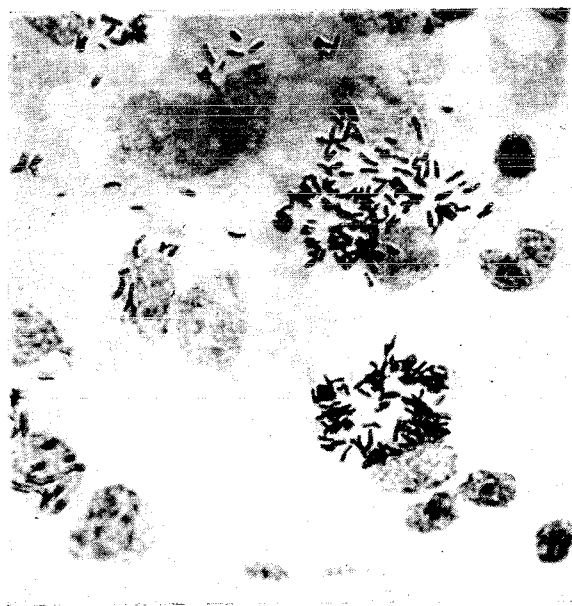
1. ASAMI, S.: 1932. *La lepr.* 3 (4).
2. AZEVEDO, PAEZ DE: 1913. *Brasil med.* 27 (32): 333.
3. BAYÓN, H.: 1914. *Lepra.* 14: 50-62.
4. BURNET, E.: 1938. *Ann. Inst. Pasteur Tuniz.* 27 (4): 360-367 y 341-359.
5. BULL: 1907. *Journ. of Hyg.* 7: 337.
6. CILENTO, R. W. y NORTH, E. A.: 1931. *Med. Journ. Austral.* 2: 767-775.
7. COWDRY, E. V.: 1938. *Puerto Rico Journ. Publ. Health Trop. Med.* 14 (2).



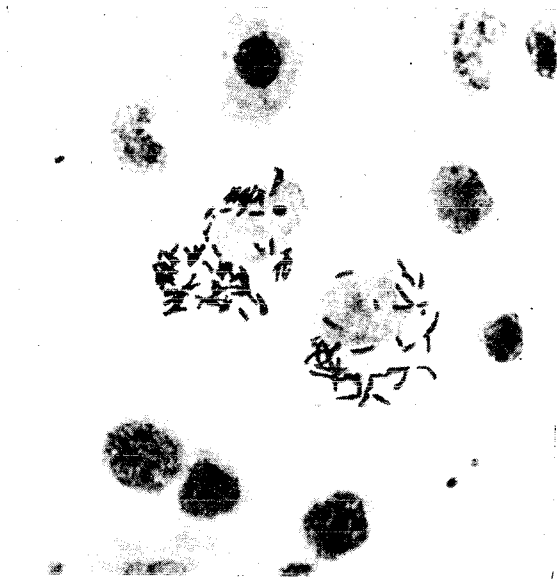
8. COWDRY, E. V. y HEIMBURGER, L. F.: 1935. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 32: 1422-1423.
9. COWDRY, E. V. y RAVOLD, A.: 1938. *Puerto Rico Journ. Pub. Health Trop. Med.* 4 (1): 3-15.
10. CURRIE, D. y HOLLMANN, H. T.: 1911. *U. S. Pub. Health Bull.* 41: 13-26.
11. CHORINE, V.: 1934. *Bull. Soc. Path. Exot.* 27: 222-224.
12. DEAN, G.: 1903. *Zblat. Bakt. Orig.* I. 34: 222-224 y 1905. *Journ. Hyg.* 5: 99-112.
13. GAVRILOV, W. y DUBOIS, A.: 1936. *C. R. Soc. Biol.* 1384 y 1938. *Inter. Journ. Lep.* 6: 515-523.
14. GERBINIS, P.: 1933. *Bull. Soc. Pat. Exot.* 26: 1135-1137.
15. ISHIWARA, T.: 1913. *Zblat. Bakt. Orig.* I. 67: 446-450.
16. HOLLMAN, H. T.: 1912. *U. S. Pub. Health Rep.* 27 (3).
17. KITASATO, S.: 1909. *Zeit. Hyg.* 63: 507-517.
18. LAMPE, P. H. J. y MOOR, C. E.: 1935. *Gen. Tij. Nederl. Ind.* 75: 634, y 1936, 76: 1619-1641.
19. LEGER, M.: 1919. *Bull. Soc. Path. Exot.* 12 (4): 170-171.
20. LOWE, J.: 1934. *Ind. Journ. Med. Res.* 22 (1): 187-198.
21. MARCHOUX, E.: 1934. *Intern. Journ. Lep.* 2 (1): 88-95, y 1939. *Rev. Imm.* 5 (6): 523-534.
22. MARCHOUX, E. y CHORINE, V.: 1932. *Bull. Soc. Path. Exot.* 25: 1025-1026; 1935. *Ann. Inst. Past.* 55 (6): 632-640; 1938. *Id.* 61: 296-299; 1939. *Bull. Soc. Path. Exot.* 31: 809-815; 1939. *Ann. Inst. Past.* 63: 101-104.
23. MARCHOUX, E. y SOREL, F.: 1912. *Ann. Inst. Past.* 26: 673-700.
24. MC COY, G. W.: 1913. *U. S. Pub. Health Bull.* 61: 27-30.
25. MEZINCESCU, D.: 1908. *C. R. Soc. Biol.* 64: 514-515.
26. MUIR, E. y HENDERSON, J. M.: 1928. *Ind. Journ. Med. Res.* 15: 807-811.
27. OHTAWARA, T. y ICHIHARA, T.: 1932. *Zblat. Bakt. Orig.* I. 123: 495-503, y 1935. *Id.* 134: 316-318.
28. OTA, *et al.*: 1932. *C. R. Soc. Biol.* 111: 287-289.
29. RABINOWITSCH, L.: 1903. *Zblat. Bakt. Orig.* I. 33 (8): 577-580.
30. SALLE, A. J.: 1934. *Journ. Inf. Dis.* 54: 364-359.
31. SELLARDS, M. A. y PINKERTON, H.: 1936. *Bull. Soc. Path. Exot.* 29: 847-851.
32. STEFANSKY, W. K.: 1903. *Zblat. Bakt. Orig.* I. 33 (7): 481-487.
33. UCHIDA, M.: 1923. *Saik. Zass.* Nº 228.
34. WALKER, E. L. y SWEENEY, M. A.: 1935. *Amer. Journ. Trop. Med.* 15 (5): 507-513.
35. WATANABE, J.: 1936. *Kitasato Arch. Exp. Med.* 13: 158-168, y 1937. *Id.* 14: 125-141.
36. ZINSSER, H. y CAREY, E. G.: 1912. *Journ. Amer. Med. Assoc.* 58: 692-695.



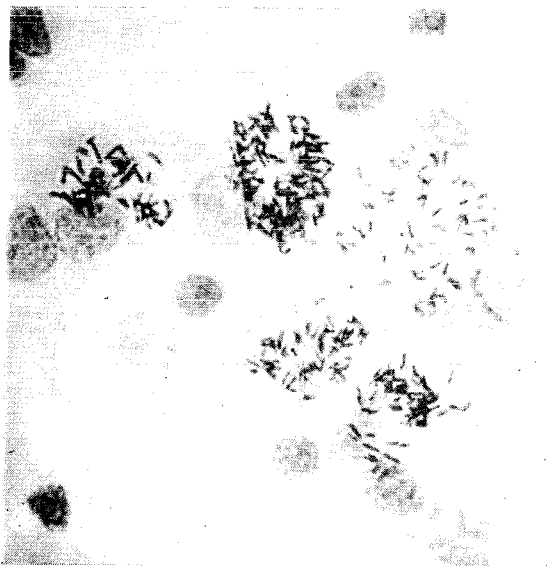
FOT. Nº 3. — Preparado microscópico de bazo de conejo, inoculado con la cepa « L. M ».



FOT. Nº 4. — Preparado microscópico de impresiones de bazo de gallina inoculada con la cepa « L. M ».



For. Nº 1. — Preparado microscópico de impresiones de bazo de conejo, inoculado con la cepa  
«L. M».



For. Nº 2. — Preparado microscópico de impresiones de bazo de conejo inoculado con la cepa  
«L. M».



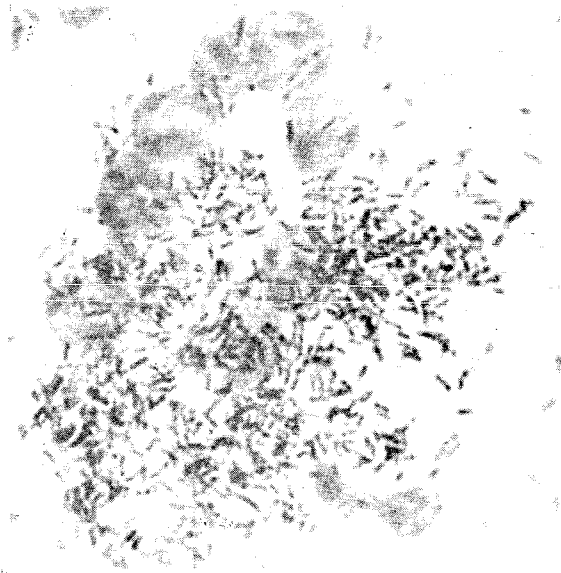
Lámina en colores, pintada por el señor J. Bastanier, de un preparado microscópico de bazo de gallina inoculada con la cepa « L. M. ».

Oc. K12, 15 ×; ob. 100; 1.500 ×



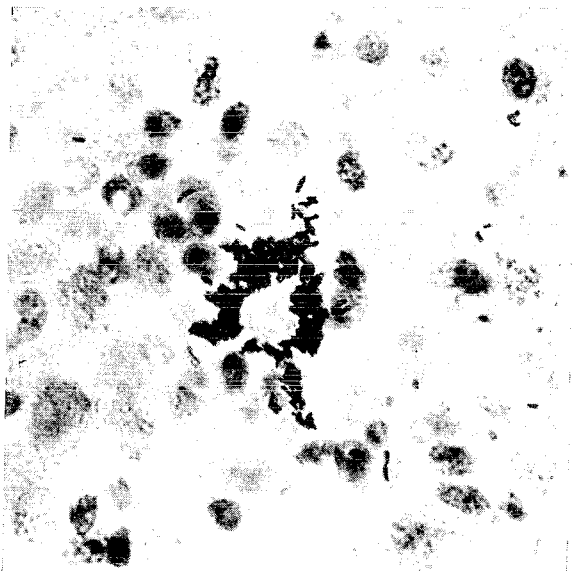
For. Nº 7. — Preparado microscópico de impresiones de bazo de paloma, inoculada con la cepa « L. M. ».

Aumento 900 x.

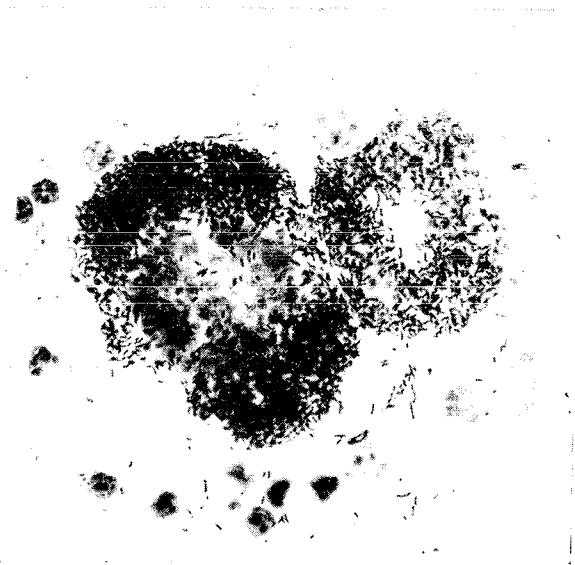


For. Nº 8. — Preparado microscópico de bazo de paloma, inoculada con la cepa « L. M. ».

Aumento 1.800 x.



FOT. Nº 5. — Preparado microscópico de impresiones de bazo de gallina inoculada con la cepa « L. M ».



FOT. Nº 6. — Preparado de impresiones de bazo de paloma, inoculada con la cepa « L. M ».  
Aumento 900 x.