

Estudios sobre leptospiras

II. - *Leptospira bonariensis* (n. sp. ?) aislada en las ratas grises de la ciudad de Buenos Aires

Por ENRIQUE SAVINO y EDUARDO RENNELLA

En trabajos anteriores (Savino y Rennella, 1942), hemos estudiado las condiciones de desarrollo de diferentes cepas de leptospiras y sobre la base de estos resultados las dividimos en dos grupos de acuerdo a la modalidad de su crecimiento en medio nutritivo sintético y semisintético. En este trabajo estudiamos los caracteres antigénicos de los citados microorganismos.

I. - ANTECEDENTES

Después que Inada e Ido (1915), aislaron leptospira, por primera vez, de un caso humano de enfermedad de Weil y la denominaron *Leptospira icterohaemorrhagiae*, numerosos autores demostraron su presencia en roedores y otros animales.

Ido, Ito y Wani (1918), describen en el Japón el agente etiológico de la enfermedad conocida con el nombre de « Nanukayami » o enfermedad de 7 días, lo denominan *Leptospira hebdomadis*, y fué identificado con la leptospira Akiyami Tipo B de Koschima, Shiwozawa y Kitayama (1924); hallazgo que por otra parte fué confirmado por Stéfanopoulo y Hosoya (1928). Según los autores japoneses un ratón de campo, el *Microtus montebelloi*, es depósito natural de esta enfermedad. Mochtar, De Reede y Rijkeküsch (1941), describen en las Indias Orientales Holandesas leptospirosis humana por *Leptospira hebdomadis* y en esa misma región Kouwenaar y Wolff (1930), aíslan leptospiras en perros que Esseveld, Collier y Mochtar (1940), la identifican como *Leptospira hebdomadis*.

Sardjito y Postmus (1927), aíslan en Batavia, en *R. norvegicus*, una cepa de leptospira, que Walch y Soesilo (1927 y 1939) la

Presentado para publicar el 1º de junio de 1943.

identificaron con unas cepas aisladas por ellos de pacientes y la diferenciaron de las especies de leptospiras conocidas. Luego, Esseveld y Collier (1939), y Mochtar y Collier (1939), identifican estas cepas de leptospiras con otras aisladas por ellos — en *R. norvegicus* de Batavia y de Makassar, y en perros y en gatos de Batavia — y la denominaron *Leptospira bataviae*. Es interesante por otra parte consignar que Schüffner (1938), identificó como de esta especie la *Leptospira mitis* aislada por Mino (1938), de un paciente en Vercelli (Italia) y por Varvello (1940), en *R. norvegicus*. De confirmarse estos resultados, en realidad *L. bataviae* tendría que pasar a sinonimia.

Kaneko, Kotorii y Aoki (1935), examinan 1426 animales de campo pertenecientes a la especie *Apodemus speciosus speciosus*, en el distrito de Hasami (Japón), y encuentran 209 (14.7 %) infectados por la *Leptospira autumnalis* o leptospira Akiyami tipo A, de Koshina, Shiwosawa y Kitayama (1924). También debemos agregar que Schüffner (1938), identifica a esta especie de leptospira con el tipo Rachmat aislado por Baermann (1923), en Sumatra, de la sangre de un paciente. La *Leptospira autumnalis* es el agente etiológico de la enfermedad conocida en el Japón con el nombre de «Hasamiyami» o fiebre otoñal. Mochtar (1940), demuestra la presencia de la citada especie de leptospiras en cerdos de Batavia. Aoki, Kaneko y Marimoto (1935), utilizan diferentes métodos para demostrar la presencia de *Leptospira autumnalis* en 50 ejemplares de *Apodemus speciosus speciosus* y obtienen cultivos positivos en el 40 % de los casos. También debemos recordar que Schiozawa (1928) demostró que la leptospira Akiyami Tipo A era diferente de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*. Y por otra parte Vaucel aisló, de un caso humano, en Hanoi (Indochina), una cepa de leptospira que denomina «K» y que suerológicamente parece tratarse de la *Leptospira autumnalis*. También es probable que la leptospira tipo Pomona — descrita en Queenslad (Australia) por Clayton y Derrick (1937), Lumley (1937) y Johnson (1938), y que fué aislada en casos humanos, en ratas y en perros de Batavia (Mochtar y Jollier, 1939) — corresponda a la *Leptospira autumnalis* (Clayton y Derrick, 1937).

Sardjito, Mochtar y Wirasmo (1937), examinan en Java 104 ratas de campo (*Rattus rattus brevicaudatus*) y aíslan 23 cepas de leptospiras que se caracterizan por su poca virulencia para el cavia y por ser muy patógena para la marmota, provocando ictericia. Esseveld y Mochtar (1938), estudian los caracteres antigé-

nicos de esta cepa y de acuerdo a sus resultados crean la nueva especie *Leptospira javanica*. También fué determinada la presencia de *Leptospira javanica* en los animales siguientes: *Rattus concolor*, en Makassar (Esseveld, Collier y Mochtar, 1940, y Mochtar y Collier, 1939); *Rattus rattus*, en Java (Esseveld, Collier y Mochtar, 1940); *Rattus rattus diardi*, en Makassar (Mochtar y Collier, 1939); en *R. norvegicus* y en gatos de Batavia (Esseveld, Collier y Mochtar, 1940).

También, Sardjito, Mochtar y Wirasmo (1937), aislan en *Rattus rattus brevicaudatus*, en Ambarawa (Java) el tipo «Salinem» que según Esseveld, Collier y Mochtar (1940) correspondería la *Leptospira pyrogenes* Vervoort (1923). El tipo «Salinem» fué aislado de un enfermo en la localidad del mismo nombre en Java (Mochtar, 1927) y probablemente corresponda a la cepa «Zanoni» proveniente de ratas grises de Australia y provisoriamente designada con el nombre de *Leptospira australis* por Walsh-Sorgdrager, Bohlander y Schüffner (1938). También Mochtar (1940), determina la presencia de esta especie de leptospira, en cerdos de Batavia.

Finalmente, resumiendo los trabajos de Esseveld, Collier y Mochtar (1940), Esseveld y Collier (1938), Mochtar y Collier (1939), Mochtar y Collier (1940) y Mochtar y Esseveld (1939), tenemos: 1º, entre 174 cepas, aisladas en Java, de 1042 *Rattus rattus brevicaudatus*, 164 eran *L. javanica* y una *L. bataviae*; 2º, entre 185 cepas aisladas de *R. norvegicus*, de la ciudad de Batavia, 15 pertenecían a *L. javanica* y 100 a *L. bataviae*; 3º, el 50 % de las ratas grises de los suburbios de Batavia están infectados con ambas especies de leptospiras; 4º, examinados 223 gatos de más de 1.5 kilo de peso, obtienen 13 cepas de leptospiras, 7 clasificadas como *L. batavia* y 6 pertenecían a *L. javanica*; 5º, estudiadas 600 ratas en Makassar (Celebes), encuentran *L. javanica* en *Rattus concolor* (9%), en *Rattus rattus brevicaudatus* (2%) y en *Rattus rattus diardi*; 6º, *L. bataviae* es patógena para el cavia que muere con ictericia, en cambio, *L. javanica* es poco virulenta para el mismo animal y los animales inoculados, al cabo de 3 semanas, presentan leptospiras en el riñón.

II. - MÉTODO

a) *Preparación de suero inmune de conejo.* — Fué obtenido de acuerdo a la técnica descrita en un trabajo anterior (Savino y Rennella, 1943).

b) *Técnica de titulación de anticuerpos.* — Es la descrita en un trabajo anterior (Savino y Rennella, 1943).

c) *Método de absorción de leptospirolisinas.* — Con este objeto tomamos 160 ml de un cultivo de leptospiras desarrolladas en el medio líquido descrito por nosotros y tras una incubación de 8 a 10 días lo centrifugamos a 5.000 r. p. m. durante 1 hora a 10°C. El precipitado de leptospira obtenido lo suspendimos en 1.5 ml del medio de cultivo y a 0.15 ml de suero sanguíneo, diluido al 0.1 % en solución salina al 0.85 %, le agregamos 0.6 ml de la suspensión de leptospiras. Agitamos la mezcla y la llevamos a la estufa a 29-30° durante 20 horas; separamos las leptospiras remanentes por centrifugación y con el líquido sobrenadante realizamos las pruebas de titulación de leptospirolisinas. Como testigo a 0.15 ml de la dilución arriba citada del suero sanguíneo, le agregamos 0.6 ml de medio de cultivo y lo dejamos en la estufa en las mismas condiciones que el suero absorbido.

La concentración de las leptospiras empleadas en la absorción de los sueros variaba de 2.500 a 1.600×10^6 microorganismos por ml.

d) *Cepas de leptospiras utilizadas.* — Hemos estudiado las cepas de leptospiras mencionadas por nosotros en trabajos anteriores, es decir: RGA, Lisboa, STIV, China, Montevideo, 189, 161, 192, 462, 467, MA y R₁, cuyas procedencias fueron citadas en dichos trabajos. Además de estas cepas hemos estudiado también las siguientes: M₂, 47, 53, 57 y 256. (La cepa M₂ fué aislada, en Montevideo por el Profesor Dr. R. V. Talice (*) de un caso humano, y las restantes fueron aisladas por nosotros de las ratas grises que llegan a la Sección Peste). También debemos agregar que las cepas RGA, China y Lisboa, figuran en la literatura como tipo de *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Zimmermann 1930, Carlinfantini 1938 y Kaufmann 1938). Además la cepa RGA fué aislada en Berlín en el año 1915, de un paciente atacado por la enfermedad de Weil. De todas las cepas citadas sólo eran patógenas para el cavia las siguientes: R₁, 47, 53, 57, M₂ y 256.

Los ensayos de leptospirolisina cruzada de todas las cepas con los diferentes sueros nos permitió dividir las en dos grupos. El grupo A incluye las cepas RGA, China, Lisboa y STIV, y el grupo B las cepas: Montevideo, 189, 161, 192, 462, 467, MA, R₁, M₂, 47, 53, 57 y 256. Las cepas de cada grupo lisan entre sí en un título

(*) A quien agradecemos la gentileza de habernos facilitado dicha cepa.

igual al del suero homólogo (valor que era 1/100.000 y en algunas ocasiones 1/500.000) y en cambio no lisan aún en el título de 1/100 cuando se colocan frente al suero del otro grupo.

En los experimentos de absorción de leptospirolisinas hemos tomado en cada caso dos cepas en relación con los sueros inmunes correspondientes y los ensayos realizados fueron los siguientes: RGA-462 ; China-Montevideo ; STIV-189 ; STIV-MA ; STIV-R₁ ; Lisboa-161 ; RGA-China ; China-STIV ; STIV-Lisboa ; Lisboa-462 ; 462-Montevideo ; Montevideo-189 ; 189-MA ; MA-467 ; 467-192 ; 192-161 ; 161-R₁ ; R₁-RGA ; RGA-256 ; 256-R₁ ; 256-Lisboa ; 256-53 ; STIV-53 ; M₂-China, M₂-MA ; 47-Lisboa ; 47-192 ; 47-57, y 57-RGA.

Los resultados de los 27 ensayos de absorción de leptospirolisinas están sintetizados en la Tabla 1, donde An y Am representan las cepas del grupo A, y Bn y Bm las del grupo B.

TABLA I

Cepa estudiada	Suero inmune	Título del suero inmune sin absorber	Resultado de la absorción			
			Cepa de absorción	Título del suero absorbido	Cepa de absorción	Título del suero absorbido
An	An	1/100.000	An	0 (*)	Am	0
Am	»	»	»	0	»	0
An	Am	»	»	0	»	0
Am	»	»	»	0	»	0
Bn	Bn	1/100.000	Bn	0	Bm	0
Bm	»	»	»	0	»	0
Bn	Bm	»	»	0	»	0
Bm	»	»	»	0	»	0
Am	An	1/100.000	An	0	Bn	1/100.000
Bn	»	0	»	0	»	0
An	Bn	0	»	0	»	0
Bn	»	1/100.000	»	1/100.000	»	0

(*) En realidad el signo 0 indica que el valor del suero es inferior a 1/10.000.

III. - RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la absorción de leptospirosilinas consignados en la tabla 1, nos permiten dividir a las cepas de leptospiiras estudiadas en dos grupos. El primero lo forma las cepas: RGA, STIV, China y Lisboa, y el segundo las denominadas 462, Montevideo, 189, MA, 161, 256, 53, M₂, 47, 57, 467, 192 y R₁.

Debemos agregar que los sueros obtenidos con las cepas de cada grupo no lisan a las leptospiras del otro grupo aún en la dilución 1/100 y que en algunos ensayos realizados los sueros eran absorbidos con las cepas del mismo grupo en diluciones menores a 1/1000.

Si por otra parte nosotros consideramos que el primer grupo corresponde a la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, nos lleva a la conclusión que la especie de leptospiras aisladas, tanto en las ratas grises de la ciudad de Buenos Aires como en los casos humanos de Montevideo, no pertenecen a dicha especie. Como no poseemos todas las especies aisladas de ratas y de otros roedores y que se encuentran descritas en la literatura, no podemos afirmar que las leptospiras del segundo grupo pertenezcan a una especie nueva y por dicho motivo le damos temporariamente el nombre de *Leptospira bonariensis* hasta que pueda tenerse la oportunidad de poder compararla con las otras especies de leptospiras conocidas. Por otra parte *L. bonariensis* se diferencia de *L. icterohaemorrhagiae* por el hecho de que sólo la última es capaz de desarrollar en los medios nutritivos sintéticos y semisintéticos estudiados (Savino y Rennella, 1942). Además, la *Leptospira bonariensis* mata al cavia con producción de ictericia.

IV. - CONCLUSIONES

1° — Estudiamos la constitución antigénica de 17 cepas de leptospiras: dos pertenecen a casos humanos registrados en Montevideo, once fueron aislados en ratas grises de la ciudad de Buenos Aires y las cuatro restantes están clasificadas como *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

2° — Por sus caracteres antigénicos y culturales las cepas de leptospiras aisladas de los casos humanos y de ratas no pertenecen a la denominada *Leptospira icterohaemorrhagiae* y temporariamente la designamos con el nombre de *Leptospira bonariensis*.

V. — BIBLIOGRAFÍA

1. AOKI, Y.; KANEKO, K., y MORIMOTO, T. 1935. — *Weitere studien über die « Hasamiyami »*. II *Vergleichende Untersuchungen über die Methoden zum Nachweis des Erregers von « Hasamiyami » (Spirochaeta autumnalis) im Rattenkörper*. *Zeit. Hyg. Infektionskr.* **117** (2): 208-215.
2. BAERMANN, G. 1923. — *Klinische und Experimentelle Untersuchungen über Spirochaetenerkrankungen und Spirochaeten (in Delhi Sumatras Ostküste)*. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **63**: 885.

3. CARLINFANTI, E. 1938. — *Studien über die antigenen Eigenschaften der Spirochaeta icterohaemorrhagiae*. *Zeit. Imm. Exp. Therap.* **94**: (5-6), 426-436 y 1939: *Boll. Inst. Serot. Milanese* **18**: 504.
4. CLAYTON, G. E. B., y DERRIK, E. H. 1937. — *The presence of leptospirosis of mild type (seven-day fever) in Queensland*. *Med. Journ. Australie* **1** (18): 647-654.
5. ESSEVELD, H., y COLLIER, W. A. 1938. — *Leptospirosis in cats in Java*. *Zeit. Imm. Exp. Therap.* **93**: 512-528.
6. ESSEVELD, H., y COLLIER, W. A. 1939. — *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **79**: 560.
7. ESSEVELD, H.; COLLIER, W. A., y MOCHTAR, A. 1940. — *Leptospirosis in the Netherlands East Indies, with special reference to the virus reservoirs*. *Med. Dienst. Volks. Ned. Indië* **29** (1-2): 1-9.
8. ESSEVELD, H., y MOCHTAR, A. 1938. — *Over het voorkomen van een nieuw leptospira-type (L. javanica) en het « Salinem-type » bij veldratten op Java*. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **78** (25): 1513-1522.
9. INADA, R., e IDO, Y. 1915. — *Tokyo Ijushuski*, N° 198.
10. ITO, Y.; ITO, H., y WANI, H. 1918. — *J. Exp. Med.* **28**: 435.
11. JOHNSON, D. W. 1938. — *Mild leptospirosis in Southern Queensland: a classification of the infecting Leptospira a report of eight further cases of the disease*. *Med. Journ. Australie* **1** (9): 805-813.
12. KANEKO, K.; KOTORII, S., y AOKI, Y. 1935. — *Weitere Studien über die « Hasamiyami » I. Statische Betrachtungen der mit Distrikt Hasami gefangenen spirochaetenträgenden Feldratten*. *Zeit. Hyg. Infektionskr.* **117** (2): 202-207.
13. KAUFMANN, O. 1938. — *Vergleichende serologische Untersuchungen mit verschiedenen Stämmen de Spirochaeta icterogenes und mit der Spirochaeta canicola*. *Zeit. Imm. Exp. Therap.* **93** (3-4): 354-357.
14. KOSHINA, Y.; SHIWOZAWA, S., y KITAYAMA, K. 1924. — *Japan Med. Wld.* **4**: 268.
15. KOUWENAAR, W., y WOLFF, J. M. 1930. — *Hondern als dragers van leptospira. (Voorloopige mededeeling)*. *Nederl. Tijdschr. Geneesk.* **74** (4): 376-380.
16. LUMLEY, G. 1937. — *Leptospirosis in Queensland: a serological investigation leading to the discovery of distinct serological groups of Leptospirae causing leptospirosis as it occurs in Northern Queensland, with some other related observations*. *Med. Journ. Australie* **1** (18): 654-664.
17. MINO, P. 1938. — *Atti Soc. Med. Milano* **25**: 2; *Minerva med.* **1** (18); *Giorn. Reale Accad. Med. Torino* **2**: 12 y **4**: 3.
18. MOCHTAR, A. 1927. — *Onderzoekingen orutrent leptospirastammen*. Tesis. Amsterdam.
19. MOCHTAR, A. 1940. — *Over het voorkomen van leptospira's bij varkens te batavia*. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indie* **80** (40): 2334-2345.
20. MOCHTAR, A., y COLLIER, W. A. 1939. — *Die Ratten als Virusreservoir bei Leptospirose*. *Allgem. Path. Bakt.* **2** (5): 319-333.
21. MOCHTAR, A., y COLLIER, W. A. 1939. — *Het Leptospira-Onderzoek bij Honden te Batavia*. *Ned. Ind. Blad. Diegeneesk.* **51** (6): 339-346.
22. MOCHTAR, A., y COLLIER, W. A. 1940. *De Leptospira javanica als een zelfstandige leptospira soort*. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **80** (3): 131-137.
23. MOCHTAR, A.; DE REEDE, C. A., y RIJKEKÜSCH. 1941. — *Het voorkomen van nanukayami op Java*. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **81** (46): 2292-250.
24. SARDJITO, M., y POSTMUS, S. 1927. — *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* **67**: 734.

25. SARDJITO, M.; MOCHTAR, A., y WIRASMO. 1937. — *Antonie V. Leeuwenhoek* 4: 1; *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* 77: 457.
26. SAVINO, E., y RENNELLA, E. 1942. — *El cultivo de la Leptospira icterohaemorrhagiae Inada e Ido, 1915. I. Condiciones y factores que rigen su desarrollo in vitro. Método para la cuenta de leptospiras. II. Nuevo medio de cultivo. Rev. Inst. Bact. «Dr. Carlos G. Malbrán»* 9 (1): 5-18; y *Rev. Soc. Argentina Biol.* 18 (3): 176-189.
27. SAVINO, E., y RENNELLA, E. 1942. — *El cultivo de la Leptospira icterohaemorrhagiae Inada e Ido 1915. III. Ensayo del valor nutritivo de diversas sustancias. Rev. Soc. Argentina Biol.* 18 (6): 566-678, y *Rev. Inst. Bact. «Dr. Carlos G. Malbrán»* (en prensa).
28. SAVINO, E., y RENNELLA, E. 1942. — *El cultivo de la Leptospira icterohaemorrhagiae Inada e Ido 1915. IV. Cultivo en medio sintético y semisintético. Rev. Soc. Argentina Biol.* 18 (6): 579-583, y *Rev. Inst. Bact. «Dr. Carlos G. Malbrán»* (en prensa).
29. SAVINO, E., y RENNELLA, E. 1943. — *Estudios sobre leptospiras. 1. Método para la determinación de leptospirolisinas. Rev. Inst. Bact. «Dr. Carlos G. Malbrán»* (en prensa).
30. SCHIOZAWA, S. 1928. — *Immunologische Beziehung zwischen verschiedenen Leptospiren. Japan Med. Wld.* 8 (2): 39, y *Zblat. Bakt. Orig.* 109 (1-4): 80-93.
31. SCHÜFFNER, W. A. P. 1938. — *Cong. Med. Trop. Mal.*
32. STÉFANOPOULO, G. J., y HOSOYA, S. 1928. — *C. R. Soc. Biol.* 98: 1317.
33. VERCELLO, V. 1940. — *Sulla infestazione dei ratti di Vercelli con tipi diversi de leptospire. Ann. d'Igiene* 50 (4): 163-168.
34. VAUCEL, M. 1937. — *Leptospirosis in Indo-China. Arch. Inst. Pasteur Indochine* 7: 137-176.
35. VAUCEL, M. 1937. — *Essai d'identification d'un leptospire isolé a Hanoi au cours d'une affection humaine intergène. Spécificité de « type ». Bull. Soc. Med. Chir. Indochine* 15 (4): 385-392.
36. VERVOORT, H. 1923. — *Rep. Far East. Assoc. Trop. Med.* 683. J. Bale Sons y Danielsson, Londres.
37. WALCH, E., y SOESILO, R. 1927. — *Vergelijkende serologisch Onderzoek van te Batavia geïsoleerde en andere leptospirastammen. Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* 67: 84; 1939. *Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* 79 (9): 547.
38. WALCH-SORDRAGER, B.; BOHLANDER, L., y SCHÜFFNER, W. A. P. 1938. — *Over leptospirosis in Australië en eenige opmerkingen over de Soortbepaling der daar geïsoleerde Stammen. Geneesk. Tijdschr. Nederl. Indië* 78 (38): 2299-2308.
39. ZIMMERMANN, E. 1930. — *Zur serologischen Differenzierung der Spirochäten vom Weiltyp. Zeit. Imm. exp. Therap.* 68 (3-4): 364-374.