

Tesis de Posgrado

Presencia de leptospira en aguas naturales de la República Argentina

Locascio, Guillermo

1964

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Locascio, Guillermo. (1964). Presencia de leptospira en aguas naturales de la República Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1215_Locascio.pdf

Cita tipo Chicago:

Locascio, Guillermo. "Presencia de leptospira en aguas naturales de la República Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1215_Locascio.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Presencia de Leptospira en Aguas Naturales
de la República Argentina**

**Nueva Técnica de Aislamiento
Estudio Suerológico de Cepas Aisladas**

GUILLERMO LOCASCIO

TESIS' 1613

**Tesis Presentada para Optar al Título de
Doctor en Química**

AÑO 1964

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Presencia de Leptospira en Aguas Naturales
de la República Argentina**

GUILLERMO LOCASCIO

Resumen de la Tesis Presentada para Optar al Título de
Doctor en Química

R. de Tesis 1425

AÑO 1964

Este trabajo fué iniciado en el laboratorio de la
Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales con la guía del Dr. Enrique Savino,
y continuado en el laboratorio del Equipo de Leptospi-
rosis del Instituto de Zoonosis, I.N.T.A., bajo la di-
rección de su Jefe,

Dr. Roberto A. Cacchione

Padrino de esta tesis.

RESUMEN

La obtención de cultivos puros de *Leptospira* a partir de aguas, se realiza con métodos laboriosos, no obteniéndose con frecuencia los resultados deseados. Estas investigaciones revisten interés epidemiológico en el caso de cepas patógenas, mientras que por otro lado el conocimiento de las propiedades antigénicas de las cepas acuícolas y sus variedades será de importancia fundamental para su taxonomía, actualmente sólo en parte definida.

Este trabajo está orientado a contribuir al estudio de estos problemas.

Se comenzó por el estudio de métodos de aislamiento. Dado que no se deseaba emplear para ello medios que sólo permiten el desarrollo de leptospiras saprófitas, se utilizó en un comienzo el medio de Savino y Rennella modificado, y luego el de Korthof.

Las primeras tentativas fueron realizadas mediante la "filtración por cobayo" propuesta por Schüffner, y siembra de las muestras en medio de Savino y Rennella modificado. Se concentraron previamente las leptospiras de las aguas mediante centrifugación diferencial.

Con estos métodos no se obtuvieron en ningún caso cultivos de leptospiras; los hemocultivos permanecieron en general estériles, y la siembra directa produjo siempre sólo intensa contaminación.

En ensayos realizados empleando combinaciones de activadores del desarrollo y factores de crecimiento de leptospiras, se observó que ciertas sustancias permitieron el desarrollo de una cepa pura, pero no el cultivo de estos microorganismos a partir del agua.

En vista de estos resultados se recurrió a la filtración previa de las muestras, a fin de purificarlas antes de efectuar su siembra.

Se ensayaron las bujías Pasteur-Chamberland L₃, y luego de algunos intentos se pudo comprobar, mediante filtración de suspensiones diluidas de leptospiras, que estos elementos no permitían el

paso de dichos microorganismos, al menos en cantidad suficiente. Experiencias similares llevadas a cabo con discos Seitz EK₂ mostraron que los filtros ensayados presentaban el mismo inconveniente.

La búsqueda de un elemento filtrante más adecuado se orientó entonces hacia las membranas. Fueron ensayadas las Millipore tipo HA, en un soporte "Isopor".

En ensayos preliminares, estos filtros dejaron pasar una cantidad apreciable de leptospiras y permitieron la separación de éstas de los microorganismos de una muestra de agua adicionada con un cultivo de *L. biflexa*.

Mediante este sistema se aislaron algunas cepas directamente en estado de pureza, pero en otros casos se obtuvieron cultivos de leptospira intensamente contaminados, que sólo en algunas oportunidades pudieron posteriormente ser purificados mediante filtración por otras membranas de menor tamaño de poro y/o sulfanilamida. Esta irreproducibilidad hizo sospechar la existencia de defectos en el soporte empleado o las membranas HA utilizadas hasta ese momento.

Por ello, se realizaron nuevas experiencias, filtrando 18 muestras de agua de diversas procedencias, mediante soportes "Swinny", con una nueva partida de membranas de tipo HA ($0,45 \mu \pm 0,02 \mu$), PH ($0,30 \mu \pm 0,02 \mu$) y GS ($0,22 \mu \pm 0,02 \mu$), sembrando 3 ó 4 tubos con el filtrado de cada membrana. Además se inocularon las muestras sin filtrar en medio de Korthof con 4 % de sulfanilamida y, como control, en agar de Zuelzer.

En los tubos sembrados con el filtrado por HA se observó en todos los casos desarrollo de leptospiras, aunque intensamente contaminadas. Con membranas PH también se obtuvieron siempre cultivos de leptospira, con mucho menor contaminación, y se los logró puros en uno o más tubos en 6 de las 17 muestras ensayadas con estas membranas; en los casos restantes, los contaminantes más frecuentes eran otras espiroquetas.

Con membranas GS, se obtuvieron leptospiras puras en 13 de estas 18 muestras, y en otras 2 se comprobó retención de todo microorganismo capaz de desarrollar en medio de Korthof; de otras dos

FEB 28

se obtuvieron cultivos siempre asociados con espiroquetas, y además con otros microorganismos en la muestra restante.

La siembra en medio con sulfanilamida nunca produjo cultivos de leptospiras y sí intensa contaminación. Con el agar de Zuelzer se tuvieron 15 cultivos de leptospiras contaminados, luego de 4 a 7 semanas de incubación, mientras que en los 3 restantes no desarrollaron leptospiras.

De estos resultados surge la conveniencia de aplicar esta técnica para obtención de leptospiras de aguas, con membranas PH si se desea mayor sensibilidad, purificando luego los cultivos obtenidos, o con GS, si se desea tomar en cuenta sólo los cultivos obtenidos puros.

Por su rapidez, simplicidad y eficiencia se sugiere el ensayo de esta técnica para aislamiento de leptospiras de orina y otros materiales contaminados.

Para la purificación de cultivos, se ha hallado que el tipo GS da los resultados más satisfactorios.

Ensayos realizados con membranas VC (100 μ \pm 8 μ) y VM (50 μ \pm 8 μ), indican que éstas retienen las leptospiras.

Se ha logrado la purificación de numerosos cultivos obtenidos contaminados, en particular con otras espiroquetas, empleando sulfanilamida, con lo que se resolvió el problema presentado por estos microorganismos filtrables.

Sometiendo algunas cepas aisladas simultáneamente a los ensayos de diferenciación del SO₄Cu de Fúzi y Csóka, y a los de Mailloux y Kolochine Erber y de Babudieri y Zardi, se observó que con estos últimos no se obtenían resultados muy satisfactorios con muestras de cepas, por lo cual se aplicó para los 83 cultivos conservados para la prueba de Fúzi y Csóka, resultando que 13 de ellos eran inhibidos a diluciones 1:40.000 y no a 1:100.000, mientras otros 5 se comportaban de modo análogo a las cepas patógenas.

Fueron examinadas las relaciones antigénicas existentes entre 25 cepas aisladas, con 15 de las cuales se prepararon también los inmunosueros correspondientes, y las colecciones de sueros y cepas

NOTA

de todos los suerogrupos patógenos y de leptospiras biflexas del cepario de este Instituto.

La selección de cepas fué realizada incluyendo aquellas cuyo desarrollo era más fácilmente inhibido por el SO_4Cu , tomando además dos o tres de cada muestra de agua, con el fin de tener idea sobre las variedades que pueden coexistir en una misma agua.

Se ha demostrado el aislamiento de cepas diferentes de distintas porciones del filtrado en 6 sobre 9 muestras seleccionadas al efecto.

Los estudios suerológicos realizados han resultado con frecuencia dificultosos, a causa del lento desarrollo de las cepas y su tendencia a autoaglutinar.

Han sido halladas cepas de características interesantes ; unas, por sus relaciones con el grupo Semarang - Patoc 1 - Sao Paulo, otras por exhibir estrechas vinculaciones asimétricas con la cepa belga Wa Gent, y una por poseerlas con la cepa Ranchos.

Estas, y otras que han sido fácilmente inhibidas por el SO_4Cu , si bien no demuestran relaciones antigénicas con las cepas patógenas, o lo hacen a muy bajo título, continuarán siendo posteriormente estudiadas por este Instituto. -

Guillermo Hascasi

A mi madre.

A todos aquellos que se esfuerzan
en el cumplimiento de su labor,
para llevarla a cabo del mejor
modo posible.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi reconocimiento al CONSEJO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS Y TECNICAS de la República Argentina por haber otorgado una beca de iniciación para la realización de este trabajo, renovándola luego por un segundo período.

No serán suficientes mis palabras de agradecimiento para el Dr. Roberto A. Cacchione, quien no sólo ha dirigido la mayor parte de esta tesis, aportando su experiencia, sino que al facilitar los medios materiales para su prosecución impidió que ésta se viese interrumpida en momentos críticos. Por ese motivo quedo igualmente agradecido al Director de este Instituto, Dr. Victorio C. Cedro, y a las autoridades del I.N.T.A.

No puedo olvidar aquí al Dr. Enrique Savino, quien me sugirió el tema y guió la primera parte de su desarrollo.

Agradezco además a los integrantes del Equipo de Leptospirosis del I.N.T.A. y a sus ayudantes, así como a todos aquellos que de uno u otro modo han contribuido a que pudiese llevar a cabo esta tarea.

Este trabajo fué iniciado en el laboratorio de la
Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias
Exactas y Naturales con la guía del Dr. Enrique Savino,
y continuado en el laboratorio del Equipo de Leptospi-
rosis del Instituto de Zoonosis, I.N.T.A., bajo la di-
rección de su Jefe,

Dr. Roberto A. Cacchione
Padrino de esta tesis.

MOTIVO DEL PRESENTE TRABAJO

El agua constituye en ciertas condiciones un importantísimo vehículo, para las Leptospiras, siendo así una fuente de infección de capital importancia.

Aunque en general se acepta que las cepas denominadas biflexas, que se hallan abundantemente distribuídas en aguas naturales, no son patógenas, esta opinión no es compartida por todos, habiendo hechos que hacen pensar que ésta posición no puede considerarse definitiva.

En nuestro país aún son escasos los estudios sobre este tema.

La obtención de Leptospiras de agua en cultivo puro se lleva a cabo con métodos laboriosos y poco seguros. Se describe una técnica sencilla, rápida y más eficiente, y se sugiere su ensayo para aislar Leptospira en cultivo puro, partiendo de orina y otros materiales biológicos contaminados.

El estudio de las relaciones suerológicas entre cepas acuícolas es siempre de interés, pues constituye la base para su clasificación sistemática, actualmente mal definida. Por ello importa estudiar estas relaciones entre cepas de distintas procedencias, así como del mismo origen, con el fin de tener idea sobre las variedades que pueden coexistir en una misma agua.

Este trabajo está orientado a contribuir al estudio de estos problemas.

EL ORDEN SPIROCHAETALES, Buchanan 1918,

(Jour. Bact. 3, 1918, 542)

Comprende aquellos microorganismos delgados y flexuosos, de longitud entre 6 y 500 μ , con forma espiralada, con al menos una vuelta completa. Algunas formas pueden exhibir un filamento axial, una crista lateral u ondulaciones, o estriás transversales o septas (segmentaciones, más fácilmente visibles en especímenes teñidos).

En general en la sistematica de los Schizomycetes, se aprovechan los elementos morfológicos, bioquímicos, culturales y serológicos; por el contrario, los protozoos se clasifican fundamentalmente por su morfología, pues poseen estructuras más complejas. La mayor parte de las espiroquetas tienen, bajo el microscopio óptico, estructura más bien sencilla; además, en general su actividad bioquímica es escasa y poco estudiada aún. Muchas de estas espiroquetas son difíciles de cultivar u ofrecen dificultades técnicas para abordar dichos estudios bioquímicos. Por ello, la sistematica del Orden Spirochaetales ha sido siempre laboriosa.

Siguiendo a Bergey, (1), no habría, fuera de las formaciones mencionadas, un modelo significativo de protoplasma. Las formas menores se verían en el microscopio óptico de modo adecuado sólo mediante iluminación por fondo oscuro, debido a que poseerían un índice de refracción más bajo que el de las verdaderas bacterias. Parece en cambio, por ello mismo, que fuese más acertada la explicación de este hecho dada por Austoni (2), que sostiene que la no visibilidad en el microscopio común, (o mala visibilidad por contraste de fases) se debe, al menos en el caso de las leptospiras, a la gran sutileza del cuerpo, del orden de 0,1 μ , lo que lo ubicaría por debajo del poder resolutivo del microscopio óptico común.

Algunos microorganismos de este orden toman los colorantes comunes de anilina con dificultad, pero la coloración de Giemsa

y las técnicas de impregnación argéntica dan siempre buen resultado.

En algunas especies halladas en huéspedes vectores, se forman gránulos. Todas las formas son móviles. En las verdaderas bacterias, esta movilidad es debida a la acción de flagelos que poseen movimientos de látigo, pero en las espiroquetas tales estructuras no existirían. Babudieri (3) no obstante halla mediante microscopía electrónica flagelos en algunas espiroquetas, y compara sus resultados con los de otros investigadores. Bergey sostiene que las proyecciones terminales, ya sean derivadas del filamento axial o del periplasto, pueden ayudar a los movimientos, y que es posible que la crista posea una función similar, pero ninguna de estas estructuras podría explicar el violento movimiento de las espiroquetas. Esta movilidad consiste en una rápida rotación o giro alrededor del eje longitudinal, que conduce activamente al microorganismo hacia adelante o atrás, sin polaridad anteroposterior. Además las espiroquetas realizan movimientos violentos como látigo, enroscando y desenroscando sus espirales.

La multiplicación sería por fisión transversal, sin ciclo sexual conocido. Hay formas de vida libre, saprófitas y parásitas.

C.M. Wenyon (4) incluía este Orden entre los Protozoos, pero aunque aún en 1959 P.H. van Thiel (5) discute el punto, hoy la mayoría de los investigadores concuerdan con Breed, Murray y Hitchens (en Bergey) en considerarlo entre las bacterias. Este es un punto importante, pues como se dijo anteriormente, la diferenciación zoológica depende esencialmente de la morfología, y por ejemplo entre las Leptospirae no hay diferencias morfológicas tales que puedan emplearse para subdividir el género, (Alston & Broom, (6)) resultando, por consideraciones prácticas, que es necesario disponer de alguna manera de diferenciar grupos de cepas con propiedades distintas.

Ello no obsta para que Babudieri (3) proponga una clasifi-

cación nueva de todo el Orden, mucho más lógica, en base exclusiva a observaciones morfológicas, pero empleando también la microscopía electrónica. Para Bergéy, el Orden se subdividiría de la siguiente manera :

I - Organismos de longitud entre 30 μ y 500 μ , con estructura protoplasmática evidente:

Familia Spirochaetaceae (Swellengrebel, 1907)

1) Sin membrana periplástica ni estrías o septas transversales:

Género 1: Spirochaeta Especie tipo: Spirochaeta plicatilis, Ehrenberg.

2) Con membrana periplástica y estrías o septas transversales evidentes:

a) Vida libre en el limo marino:

Género 2: Saprospira Especie tipo: Saprospira grandis, Gross.

b) Parásitos de moluscos Lamelibranchiata; crista prominente:

Género 3: Cristispira. Especie tipo: Cristispira balbianii (Certes), Gross.

II - Organismos de longitud entre 4 μ y 16 μ . Sin estructura protoplasmática evidente

Familia Treponemataceae (Robinson, 1948)

1) Se tiñen fácilmente con los colorantes ordinarios de anilina:

Género 4: Borrelia Especie tipo: Borrelia anserina (Sajarcf) Bergey et al.

2) Se tiñen con dificultad, excepto con Giemsa o impregnación argéntica:

a) Anaerobios:

Género 5: Treponema . Especie tipo: Treponema pallidum (Schaudinn & Hoffmann) Schaudinn.

b) Aerobios (microaerófilos)

Género 6: Leptospira Especie tipo: Leptospira icterohaemorrhagiae (Inada e Ido) Noguchi.

Prévot (7) considera estos 6 géneros dentro de la familia Spirochaetaceae, que sería la única del Orden Spirochaetales, al

cual considera único también en una Clase.

Wilson & Miles (8) sólo consideran 4 géneros: Spirochaeta, Cristispira, Treponema y Leptospira.

Babudieri para su propuesta de clasificación en base a observaciones morfológicas por microscopía electrónica toma en cuenta la presencia o ausencia de tabiques o septas, eje (axostil), membrana ondulante o "crista", flagelos y gránulos de volutina y subdivide el orden del siguiente modo :

I.- Hay Septa : Familia Saprospiraceae.

- a. No hay membrana ondulante: Género 1: Saprospira
 b. Sí hay membrana ondulante: " 2: Cristispira

II.- No hay Septa : Familia Spirochaetaceae

- | | | | | |
|-------------------|---|------------------------|---|----------------------------------|
| a. Hay axostil | { | (Hay flagelos | " | 3: Spirella ^(x) |
| | { | (Hay volutina ... | " | 4: Spirochaeta |
| | { | (No hay flagelos (| " | 5: Leptospira |
| | { | (No hay volutina.. | " | |
| b. No hay axostil | { | (Hay flagelos | " | 6: Treponema |
| | { | (Hay "crista" (| " | 7: Cristispirilla ^(x) |
| | { | (No hay flagelos ... | " | |
| | { | (No hay "crista" | " | 8: Trichospira |

(x) Sujetos a ulterior confirmación.

Esta clasificación se justifica, porque al microscopio electrónico se observan detalles que revelan que la estructura de las espiroquetas no es tan simple como se creía anteriormente, y nuestros conocimientos sobre el tema se enriquecen continuamente con nuevos aportes.

El género Leptospira Noguchi 1917

Antecedentes

La enfermedad de Weil es una severa dolencia febril, en general acompañada por ictericia, nefritis e hipertrofia de bazo e hígado, que lleva el nombre de Adolfo Weil, profesor de Heidelberg que la reconoció como entidad clínica separada por el estudio de las características observadas en 4 casos humanos ocurri-

dos en 1870 y 1882: un químico, un soldado, un comerciante y un mozo, ocupaciones tan dispares que no daban indicio sobre su etiología. Esta permaneció desconocida hasta 1915, año en que Ryokichi Inada y Y. Ido (9) en el Japón aislan espiroquetas de un caso de enfermedad de Weil, reproducen la enfermedad y cultivan el organismo causal, que ya en Noviembre de 1914 habían observado en tejidos de hígado de cobayo inoculado con sangre de un paciente, señalando que desarrolla mejor a 22° C - 25° C que a 15° C ó 37° C en medio artificial, y que pueden penetrar a través de la piel abrasionada o aun aparentemente sana. Observan espiroquetas vivas en orina de los pacientes, hasta 25 días después del comienzo de la enfermedad, y demuestran que en el suero de éstos aparecen anticuerpos que persisten por años. Proponen para el organismo hallado el nombre de "*Spirochaeta icterohaemorrhagica japonica*"; posteriormente lo sustituyen por "*Spirochaeta ictero-haemorrhagiae japonica*" (10); luego en 1916 lo designan "*Spirochaeta ictero-haemorrhagiae*" (11) y por fin "*Spirochaeta icterohaemorrhagiae*" (12).

En Alemania, dos grupos de investigadores logran por separado, 8 meses después que los japoneses, aislar la espiroqueta, que llaman "*Spirochaeta icterogenes*" Uhlenhuth y Fromme (13, 14, 15), y "*Spirochaeta nodosa*" Hübener y Reiter (16, 17)

En 1916, L. Martin y A. Pettit aislan en Francia la cepa Verdun de *L. icterohaemorrhagiae*.

Los hallazgos japoneses fueron confirmados en Europa por otros investigadores, en soldados infectados en Francia.

Varios años antes de estos acontecimientos, en 1914, en los Estados Unidos Wolbach y Binger (18) denominaron "*Spirochaeta biflexa*" (del latín bi- dos veces y flexus- curvado) a un microorganismo espiroquético que lograron aislar de un estanque con agua dulce, en los alrededores de Boston, mediante filtración con bujías Berkefeld V. y lo describen perfecta y detalladamente.

Más tarde, Uhlenhuth y Fromme (1915) y Uhlenhuth y Zuelzer (1920) (19) también hallan organismos similares a los anteriores en el agua, aun potable, de Berlín y otras localidades, y los denomi-

nan "Spirochaeta pseudoicterogenes". Estos microorganismos, morfológicamente idénticos a los aislados de casos de Weil, fueron relacionados con estos últimos.

En años sucesivos, se hallaron espiroquetas de este tipo en aguas y fango de las más diversas procedencias; luego veremos el interés que esto despertó en numerosos investigadores.

En los EE.UU., en 1917, Hideyo Noguchi (20) estudió las cepas aisladas en Japón, otras aisladas de ratas de los EE.UU. y las aisladas por los ingleses en Flandes, hallando que estos organismos eran morfológica e inmunológicamente iguales. Por su morfología, eran distintos de toda otra espiroqueta conocida, excepto la Spirochaeta biflexa descrita por Wolbach y Binger, en medida tal que justificaba la creación de un nuevo género que denominó LEPTOSPIRA, (del griego leptus- fino, tenue y spira- espiral), proponiendo su inclusión en el Orden Spirochaetales junto con los géneros Spirochaeta, Saprospira, Cristispira, Spironema y Treponema de aquel tiempo. Aunque en años posteriores la taxonomía dentro del género Leptospira ha resultado laboriosa y sufrido modificaciones, el nombre genérico Leptospira ha ido afirmándose cada vez más.

En Bergey (1) hallamos la siguiente descripción del género:

"Organismos finamente espiralados, que miden entre 6 y 20 micrones de longitud. Las espiras miden 0,3 micrones de profundidad y 0,4 a 0,5 micrones de longitud.

En medios líquidos, uno o ambos extremos de la célula se hallan curvados en forma de gancho semicircular, cada uno de los cuales comprende 1/8 a 1/10 del organismo; tienen movimientos giratorios.

En medios semisólidos, tienen movimientos vermiformes, hacia adelante o hacia atrás. En preparados vivos, las células se observan con mayor claridad por microscopía de campo oscuro, y mucho menos claramente por microscopía de contraste de fases. No son visibles mediante iluminación ordinaria. Se tiñen con dificultad, excepto con la coloración de Giemsa y por impregnación argéntica. Mediante microscopía electrónica puede demostrarse la existencia de

un filamento axial. Requieren oxígeno para su desarrollo.

La especie tipo es *Leptospira icterohaemorrhagiae* (Inada e Ido) Noguchi."

Acerca de *Leptospira biflexa*, expresa que estas cepas desarrollan en medios simples, como el de heces de HINDLE o el de infusión de paja, siendo este un modo para diferenciarlas de las parásitas, que no desarrollan en esos medios. Hace referencia a los trabajos de Babudieri y Archetti, (1947-1948) quienes hallaron que estas leptospiras poseían "numerosas fracciones antigénicas. La distribución aparentemente al azar de antígenos iguales o muy similares entre las diferentes cepas, conduce a una amplia variedad de relaciones suerológicas extremadamente complicadas "

Y concluye: " No se han encontrado medios satisfactorios de diferenciar especies de leptospiras saprófitas, por lo que se ha hecho costumbre identificar las leptospiras no patógenas halladas en agua estancada o materiales similares, como "*Leptospira biflexa*" Noguchi. "

Morfología de las Leptospiras. Estructura al microscopio electrónico

Haremos una reseña de los trabajos más modernos que aclaran este punto.

En 1962, N.G. Miller y R.B. Wilson (21) estudian mediante microscopía electrónica *Leptospiras* provenientes de cultivos en medio de Stuart y de Cox, así como de tejidos de hígado y riñón de hamster infectado experimentalmente, hallándolas muy similares o iguales. Revelan una delgada membrana exterior que envuelve todo el organismo, flexible a juzgar por sus ondulaciones, de baja densidad a los electrones; entre esta y la pared protoplasmática hay un espacio vacío o ocupado por material de muy baja densidad a los electrones. Se aprecia un cilindro protoplasmático tubular, vacío o lleno de material de baja densidad a los electrones, rodeado por una pared de alta densidad en la que a veces aparecen gránulos muy densos.

En cortes transversales, se ve el filamento axial, excéntrico,

asociado a la superficie interna de la pared protoplasmática. En organismos provenientes de cultivos, se aprecia bifurcación neta del filamento axial. Es posible que posea una constitución multifibrilar. En los extremos del filamento axial, se ven unas estructuras esféricas, tipo perilla ("knob-like").

C.F. Simpson y F.H. White (22) observan también un filamento axial, una espira protoplasmática hueca y una membrana o vaina que cubre todo. El filamento axial y la espira protoplasmática serían para estos autores densos a los electrones, sugiriendo composición proteínica. La vaina es más clara, de baja densidad a los electrones; no sería proteínica, y se halla unida por una delgada membrana exterior que parece proteínica, de densidad elevada a los electrones.

No se aprecian diferencias de estructura entre *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *L. canicola* y *L. autumnalis*.

Es notable la ausencia de cilias o flagelos, así como de estructura interna visible del cuerpo.

No todas las leptospiras poseen ganchos terminales; Babudieri y Castelli (23) hallan que la *L. celledoni* carece de ellos, y Alston y Broom (6) expresa que una cepa de *L. benjamin* y la cepa Jackson de *L. icterohaemorrhagiae* poseen extremos rectos.

Nuevos suerotipos de leptospira; la taxonomía

Pocos años después del descubrimiento de la *Leptospira icterohaemorrhagiae*, comenzaron a aparecer otros tipos de Leptospiras parásitas, agentes etiológicos de enfermedades del hombre similares en algunos aspectos a la de Weil, pero en general menos severas.

Ido y otros, en 1918 (24) aislaron de un paciente de "Namukayami" (fiebre de los 7 días) una leptospira que no se diferenciaba morfológicamente de la *L. icterohaemorrhagiae*, pero resultaba distinta tanto en la producción de lesiones patológicas en cobayos como en su comportamiento suerológico en pruebas de Pfeiffer y de protección cruzada. Creyó haber descubierto una nueva "especie" de Leptospira, que llamó "*Spirochaeta hebdomadis*". El portador también

resultó ser otro: para la heterohaemorrhagiae era el Rattus norvegicus, y para la hebdomadis, el Microtus montebelloi.

En 1925, Koshina, Shiozawa y Kitayama (25) aislaron una nueva leptospira que llamó Akiyami A, (hoy L. autumnalis cepa Akiyami A) causante también de fiebre de los 7 días, hallando que el portador era el mismo que para la hebdomadis en esa región del país, pero con diferente virulencia para el cobayo, e inmunológicamente distinta. La distinción entre estos tipos de Leptospira se basaba en las lesiones patológicas producidas en animales de experiencia, los resultados de las pruebas de Pfeiffer y de protección cruzada, los síntomas en el hombre y datos epidemiológicos.

Los métodos de diferenciación que aplican técnicas "in vivo" no son recomendables, porque son influidos por variables tales como sexo, edad, raza y factores individuales de resistencia del huésped al parásito. Esto, junto con diferencias de virulencia entre cepas de la misma "especie", y el hecho de que esta se atenúa o desaparece por pasajes en medio de cultivo, hacen descartar el uso de estos criterios (patogenicidad, protección activa y pasiva). Por su parte, el ensayo de Pfeiffer complica sin ventajas la técnica suerológica. (27)

Respecto a los síntomas, pueden en alguna medida dividirse las formas clínicas de leptospirosis en severas y benignas, considerando si la ictericia es o no una característica prominente. Sin embargo, esto no es suficientemente constante como para servir para propósitos taxonómicos (6). Idéntica objeción merece la vinculación tipo de leptospira-portador, así como otros caracteres epidemiológicos.

Las pruebas suerológicas, en cambio, suministran una indicación sobre la composición antigénica de los microorganismos y han sido desde hace mucho tiempo empleadas como un método de diferenciación de bacterias. Por ello, podrían emplearse como base para la clasificación de leptospirosas, si estas poseyeran una constitución antigénica estable y distintiva.

Aunque en un tiempo ciertos observadores, especialmente Baer-

mann y Zuelzer (1927)(26) les negaron tales condiciones, Wolff y Broom (27) discuten los resultados anormales hallados por estos y otros investigadores, entre ellos Savino y Rennella en nuestro país (28, 29) y llegan a la conclusión de que dichos resultados no indican forzosamente un cambio en la constitución antigénica. Por lo tanto, proponen un sistema de clasificación basados en los resultados del análisis antigénico de leptospiras, fundándose en la experiencia reunida desde hacía 20 años atrás por Schüffner, Walch-Sorgdrager, Ruys, Bohlander, Gispén y otros en el laboratorio de Amsterdam.

Esta propuesta, aún de naturaleza tentativa, como se verá, ha sido aceptada como el mejor criterio actualmente disponible por el Grupo de Estudios sobre Leptospirosis de la OMS, y por el Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriológica. (30)

El análisis antigénico se lleva a cabo mediante las pruebas de microaglutinación cruzada (Martin y Pettit) empleando suspensiones vivientes de *Leptospiras*, y mediante las reacciones cruzadas de adsorción de anticuerpos, efectuadas adsorbiendo con suspensiones de leptospiras formoladas. Esta prueba había sido introducida en el estudio de las leptospiras por Ruys y Schüffner en 1934. Ambas técnicas demuestran de modo específico y directo las reacciones antígeno-anticuerpo, razón por la cual se tiene larga experiencia sobre su utilidad; se consideran como las pruebas de referencia para la evaluación de cualquier otra, y han sido preferidas hasta ahora a todas las demás técnicas de suerodiagnóstico aplicadas a leptospiras (31); muchas de ellas han caído ya en completo desuso por ser poco sensibles, complicadas o no específicas. Otras, podrán resultar útiles como diagnóstico preliminar, pero no ofrecen especificidad de tipo sino de género (2, 6). Ciertas pruebas, como la de fijación de complemento en cambio, parecen no adolecer de estas fallas; así la propuesta por Gaehtgens en 1950 (32) que emplea suspensiones de *Leptospira* como antígeno, o la de York (1952)(33). Otras, como la de Ezell y otros (34) emplean el sobrenadante de cul

tivos de leptospira centrifugados, que contiene un antígeno soluble específico en estas pruebas. Posiblemente lo mismo pueda decirse de las técnicas para identificación de suerotipos por medio de anticuerpos marcados fluorescentes, (35) pero en cualquier caso serán necesarios estudios comparativos completos y una mayor experiencia con ellas. Estas técnicas de fluorescencia simplificarían enormemente el procedimiento.

Wolff y Broom, (27) al proponer este sistema de clasificación, reconocen que los conocimientos actuales sobre las características de las Leptospira son aún bastante deficientes como para no permitir tomar una decisión acerca de los criterios con que se hará la subdivisión definitiva del género. Por eso, no justifican la designación como "especie", de un grupo de cepas de la misma constitución antigénica, pues el término tiene un sentido definido especial en todo código de nomenclatura, y proponen el empleo de un nombre que indique tanto las bases sobre las cuales se construye esta clasificación, como el hecho de que sólo es de naturaleza provisoria. La elección recae en el término "Suerotipo" - tipo serológico.

Si dos cepas, en pruebas de adsorción cruzadas con sus sueros hiperinmunes, eliminan cada una todos los anticuerpos del suero de la otra, puede concluirse que poseen los mismos antígenos. Pero si quedan, en uno o ambos inmunosueros parte de los anticuerpos, hay que adoptar un límite para decidir si las cepas pertenecen al mismo o a distintos suerotipos. Wolff y Broom, establecen que dos cepas pertenecen a suerotipos distintos si después de adsorción cruzada con cantidades adecuadas de antígeno heterólogo, en cada uno de los antisueros queda 10 % ó más del título homólogo. El límite de 10 % es arbitrario, y algunos lo consideraron excesivo y recomendaron uno menor (36) pero hoy día es el criterio aceptado universalmente.

En la definición se expresa " en cada uno de los antisueros ", y esto se justifica plenamente, entre otros, por el hecho observado repetidas veces de que existen ciertas relaciones entre cepas

que hacen asimétrico el comportamiento de estas frente a sus sueros hiperinmunes. Borg-Petersen (37) estudiando las cepas de *L. icterohaemorrhagiae* M 20 y RGA en pruebas de adsorción cruzada frente a sus sueros, halló que la M 20 eliminaba del suero anti-RGA todos los anticuerpos, pero la RGA no hacía variar apreciablemente el título homólogo del suero anti-M 20. Por ello, dedujo que la M 20 debía poseer otros antígenos además de los de la RGA. No había evidencia de que la RGA los hubiera perdido durante sus numerosos pasajes en medio de cultivo; además, reencontró esta situación entre otras cepas de reciente aislamiento, también *icterohaemorrhagiae*. Los cuadros clínicos provocados por éstas eran iguales, de lo que se deduce que la fracción adicional no está aparentemente ligada a la virulencia.

Gispen y Schüffner, (38) consideran dividida por tales hechos a la clásica *Leptospira icterohaemorrhagiae* en dos "Biotipos": completo (M 20) e incompleto (RGA). Hoy se los designa aún como *L. icterohaemorrhagiae* AB y *L. icterohaemorrhagiae* A, como lo hicieron los autores mencionados. De la definición de suerotipo, se deduce que pertenecen al mismo.

Pero Gispen y Schüffner hallan el mismo tipo de relación entre las cepas Akiyami A (completa) y Rachmat (incompleta) del suerotipo "autumnalis"; luego van Riel (39) en 1946 lo halla en *L. benjamini* y *L. canicola*; Alexander, Wetmore, Evans, Jeffries y Gleiser en 1955, (40) en *L. wolffii* y *L. grippotyphosa*; Babudieri, en 1955 y 1956 (41, 42) en *L. ballum* y *L. mini*, y en 1952 halló también este tipo de relaciones entre las *L. biflexa* (43). Aisló en 1941 de un arroyo de los alrededores de Trieste la cepa Patoc 1, y de un grifo del aeropuerto civil de São Paulo la cepa São Paulo diez años después. La Patoc 1 sería "incompleta", y la São Paulo, "completa".

Estos fenómenos y otras diferencias antigénicas pequeñas entre cepas del mismo suerotipo han quedado comprendidos dentro de divisiones taxonómicas inferiores al suerotipo. Se define, dentro de un suerotipo, que dos cepas pertenecen a subsuerotipos distintos cuando después de repetidas pruebas de adsorción cruzada, menos del 10%

del título homólogo permanece en un antisuero, y el 10% ó más en el otro. Algunos expertos, sin embargo, son partidarios de eliminar esta unidad taxonómica.

En cambio, cuando dos o más suerotipos exhiben afinidades marcadas entre sí, resulta muy conveniente por razones de orden práctico agruparlos en un "Suerogrupo" (grupo suerológico).

Los métodos suerológicos de clasificación

1) Las técnicas de microaglutinación cruzada.

Como se ha expresado, los métodos empleados para la identificación en suerogrupos de leptospiras aisladas, también se emplean para el suerodiagnóstico de pacientes humanos y de animales. En esto, las condiciones locales y las preferencias personales pueden hacer variar el método o la técnica a elegir.

Sería deseable o necesario, sin embargo, expresan Wolff y Broom, (27) a efectos de comparar resultados obtenidos por distintos observadores, que todos estos datos hubiesen sido obtenidos mediante las mismas técnicas, sobre todo tratándose de trabajos de investigación

Si bien las técnicas son muy similares en todos los laboratorios importantes, los detalles de ejecución varían en cada caso. Por ejemplo, Wolff (44) en Amsterdam prepara las diluciones de suero hiperinmune, y añade la suspensión de antígeno en volumen igual a la dilución, contando las gotas, mediante el empleo de una pipeta de Schüffner, colocándolas en placas de porcelana provistas de depresiones.

Las diluciones finales empleadas son 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 1/1.000 ... La incubación se lleva a cabo durante 2 a 4 horas a 32° C, y se lee colocando mediante un asa una gota sobre un portaobjetos, sin cubreobjetos, en el microscopio de fondo oscuro, con pequeño aumento.

Babudieri en Italia (45) y Cacchione en nuestro país (46) efectúan las diluciones en tubos de hemólisis midiendo los volúmenes de

suero hiperimmune, diluyente (solución fisiológica al 9 ‰) y antígeno vivo mediante pipetas graduadas. El antígeno se añade a la dilución de suero en una relación de 9:1. Incuban a 37° C durante 1½ a 2 horas, y leen del mismo modo que Wolff.

2) Las técnicas de adsorción cruzada.

Debe señalarse que los procedimientos de microaglutinación constituyen sólo un paso preliminar en el análisis antigénico en general, porque la verdadera composición antigénica de la cepa se puede determinar únicamente mediante las pruebas de adsorción de anticuerpos cruzada.

Un hecho aún no aclarado en las técnicas es la indicación del número de microorganismos (cantidad real de antígeno) a emplear en las pruebas. Babudieri muy recientemente propone una standardización del método.

La prueba de adsorción, tal como la llevan a cabo Wolff y Broen (47), se realiza formolando 100 ml de un cultivo bien desarrollado con 0,5 ml de formol al 40%, centrifugando luego a 10.000 rpm durante 20 minutos y mezclando 9 partes del sedimento con 1 de inmunosuero a adsorber, diluido a título standard 1:3.000. Luego de dejar la mezcla a temperatura ambiente al menos 24 horas, se centrifuga otra vez a 10.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante se emplea en pruebas de microaglutinación, empleando antígeno formolado.

Todos los autores emplean, para adsorber los anticuerpos del suero, suspensiones formoladas, y sobre el suero ya adsorbido, realizan las pruebas de microaglutinación. Para ello, Babudieri emplea suspensiones vivientes de *Leptospira*, y Cacchione suspensiones formoladas.

Esta microaglutinación es llevada a cabo por Wolff también en placas de porcelana, y los otros autores mencionados la hacen en tubos de hemólisis.

Expresión de los resultados obtenidos en las pruebas suerológicas

A efectos de facilitar la comparación, Wolff y Broom (27) proponen registrar los resultados obtenidos del enfrentamiento de una serie de diluciones de un dado suero hiperimmune contra su cepa homogénea y otras heterólogas, expresando no las diluciones límites verdaderas en que la reacción tiene lugar sino el porcentaje del título homólogo alcanzado por la reacción con las cepas heterólogas. Así, si el título homólogo es 1: 10.000 y las cepas heterólogas reaccionan hasta diluciones 1:3.000 y 1:5.000, se expresará como 30 (%) y 50 (%). Se debe mencionar el título homólogo pero no incluirlo en las tablas. En éstas, las reacciones que tienen lugar a menos del 0,1% se consignan como negativas. Wolff también propone una representación gráfica. En ella, cada reacción es representada por una barra o columna vertical cuya longitud indica el porcentaje del título homólogo obtenido en la prueba de microaglutinación.

Desde un eje horizontal, a lo largo del cual están representados los distintos suerotipos, en una posición fija definida por sus afinidades suerológicas, parten dichas barras; las que se hallan en la parte superior del diagrama representan las reacciones de la cepa considerada con los sueros de cada uno de los suerotipos ensayados, y en la de abajo, las pruebas cruzadas, o sea el suero de la cepa en cuestión frente a todos los suerotipos. En el eje de ordenadas se emplea una escala logarítmica.

Los suerotipos que se emplearán en las pruebas de adsorción serán aquellos cuyas barras indicatrices emerjan

- - - -

Respecto de la designación de las distintas fracciones antigénicas, es preferible por ahora, en vista de la anarquía reinante en su nomenclatura, no intentar designar bajo la forma de fórmula antigénica alguna los resultados obtenidos.

Algunas consideraciones sobre la inmunoquímica de las Leptospira

En 1962, Dymowska y Babudieri (48) hallan que la "lisis" de leptospiras en presencia de inmunosueros no es tal, y que sólo existe aglutinación. Colocando en presencia de Leptospiras una gran concentración de inmunosuero, hallan que si el medio está gelificado e inmoviliza las Leptospira, no se produce lisis alguna, haya o no complemento. Cae así una vieja y generalizada creencia, que sostenía que en el caso de las leptospira se produce lisis en ausencia de complemento. (2) Los autores confirman lo anterior por cortes ultrafinos de las "lysis balls", periféricos y centrales, y examen al microscopio electrónico, que revela leptospiras intactas. Además dichas "lysis balls" regeneran las Leptospira intactas por centrifugación y lavado. Consideran que el aspecto anormal de las leptospiras en presencia de concentraciones elevadas de inmunosuero se debe a un fenómeno tipo Rieckenberg, y que los dos tipos de aglutinación que se observan "lysis balls" o haces, pueden explicarse por la movilidad de los cuerpos espiroquéticos y la presencia de ganchos terminales. En el caso de los cultivos formolados, la falta de movilidad causaría la formación de "amas" irregulares, poco compactas.

Addamiano, (49) teniendo en cuenta que toda la sistemática del género se basa en la producción de anticuerpos en el conejo, estudia la influencia del método de preparación del suero inmune en la producción de anticuerpos específicos, paraespecíficos y aespecíficos. Los anticuerpos paraespecíficos son constantes, debidos posiblemente a un antígeno o grupos de antígenos secundarios, comunes a varios suerotipos y que los reúnen en suerogrupos. Para ellos, es fundamental el animal dador del suero, por lo cual se comportarían como las "funciones antigénicas potenciales" de Landsteiner, antigénicas para algunos animales y no para otros. Los anticuerpos aespecíficos son inconstantes y se deberían tal vez a fenómenos de degradación de antígenos verdaderos, o a los llamados "anticuerpos naturales". Son poco frecuentes en el conejo. La autora llega a la conclusión que es mejor dar inyecciones repetidas de antígeno, obteniéndose

sueros muy específicos ya sea inoculando antígeno vivo o muerto. Los anticuerpos producidos por el antígeno soluble contenido en el medio de cultivo son altamente paraespecíficos. El valor de las reacciones paraespecíficas y aspecíficas disminuye proporcionalmente con el aumento de los anticuerpos específicos y hay en este sentido diferencias individuales entre conejos. Por ello recomienda emplear un pool de sueros de varios conejos distintos.

Este trabajo resulta de especial importancia pues si se confrontan los resultados obtenidos en el estudio antigénico de las leptospira por diversos autores, como los de Walch-Sorgdrager (50), Wolff (44), Yamamoto (51) y Kitaoka, se hallan ciertas diferencias notables que pueden influir considerablemente en la sistemática de algunas cepas y de algunos suerotipos, y es posible que se deban no sólo a la diferencia de técnicas empleadas en su estudio sino también a los animales utilizados en la preparación de los sueros hiperinmunes.

Inducción de cambios en los caracteres antigénicos

Hemos expresado que Wolff y Broom sostienen la estabilidad de la constitución antigénica de las Leptospira. Sin embargo, será necesario tomar en cuenta los hechos siguientes, que demostrarían lo contrario. Schüffner y Mochtar (52) observan que las Leptospira que quedan sueltas después de la aglutinación por efecto de un suero homólogo, son capaces de regenerar un cultivo con las mismas características que el original. Pero Bessemans, Wittebolle y Niemegeers (53) y Bessemans y Derom (54) hallan alteraciones en la constitución antigénica de cultivos de Leptospira biflexa desarrollados por algunos pasajes en medios con suero homólogo.

Pike y Schultze (55) en 1958 cultivan *L. grippotyphosa*, *L. pomona* y *L. canícola* en presencia de inmunosuero homólogo, y observan a lo largo de series de pasajes, que las cepas disminuyen su aglutinabilidad por el suero. Mediante ensayos de absorción cruzada de anticuerpos entre la "nueva" y "vieja" grippotyphosa, comprueban que ha habido pérdida de algunos componentes antigénicos y apa

rición de otros nuevos. Repetida la experiencia más de 8 meses después, resulta que la modificación no retrograda.

Siguiendo los trabajos anteriores, Parnas, Malinowski y Halgas (56) en 1961, demuestran que es posible modificar experimentalmente los caracteres suerológicos de los suerotipos standard, sometiendo a determinadas "agresiones". Ello es realizado por repique en medios adicionados, ora con suero homólogo de alto título, ora con sustratos heterólogos obtenidos por desintegración ultrasónica. Como resultado se obtienen "nuevas cepas", en las cuales se halla disminuida la aglutinación por el suero homólogo y aparecen coaglutininas no señaladas en las tablas de Wolff y Broom. (27)

Breve reseña sobre la constitución química y composición de los antígenos

Mencionaremos someramente los resultados obtenidos por las dos escuelas norteamericanas, a las que se deben todos nuestros conocimientos sobre el tema hasta el presente, así como algunos trabajos realizados en Europa y la India.

Hiatt (1953)(57) inicia los estudios sobre el tema desintegrando organismos lavados (cepa Wijnberg) con desoxicolato de Na; extrae los lípidos con alcohol amílico y cloroformo, y dializa y concentra la fase acuosa, obteniendo lo que denomina "fracción 1". Esta no contiene lípidos, proteínas, péptidos ni aminoácidos; contiene en cambio ácidos nucleicos y otras sustancias. Resulta activa en ensayos de fijación de complemento con especificidad para todo suero antileptospira (especificidad de género), y en especial para el tipo homólogo, con el cual reacciona más intensamente.

Diversos ensayos llevan a afirmar que probablemente la parte activa es un polisacárido de naturaleza predominantemente pentosánica. Inyectado a conejos, produce anticuerpos para fijación de complemento pero que no intervienen en la aglutinación de leptospiras vivas. Se trataría de un sistema antigénico independiente.

Estos resultados son confirmados en el mismo año por M. D. Schneider (58). En 1956, N. Rothstein y C.W. Hiatt (59) estudian

extractos alcohólicos al 70% de leptospiras lavadas, con 25 cepas pertenecientes a 20 suerotipos. Luego de eliminar el alcohol por diálisis y concentrar, mediante evaporación a través del celofán, someter a electrodiálisis prolongada y separar la fase sólida formada por centrifugación, denominan a ésta última "antígeno de fijación de complemento" y al líquido sobrenadante "precipitinógeno". Ambos contienen pentosas y metilpentosas, pero no hexosas ni heptosas. No logran identificar con seguridad los azúcares presentes mediante cromatografía. Tanto el precipitinógeno como el antígeno fijador de complemento presentan espectros infrarrojos similares uno a otro (aunque no iguales) y similares también a los de otros polisacáridos bacterianos. El precipitinógeno inyectado a conejos produce precipitinas géneroespecíficas y aglutininas tipo-específicas, eliminables estas últimas por absorción con leptospiras homólogas enteras.

Los autores deducen que habría en la célula dos tipos de antígeno: uno periférico P, tipo específico, de composición desconocida (pero probablemente sea una asociación proteína-polisacárido) que sería aglutinógeno, y en ciertas circunstancias precipitinógeno o antígeno de fijación de complemento; el otro sería el antígeno somático género-específico S, un lipopolisacárido que no se revela a menos que se desintegre la célula, por ser un antígeno profundo. En caso de actuar lo haría como precipitinógeno o antígeno de fijación de complemento.

El preparado denominado "precipitinógeno" por los autores sería una mezcla de antígenos S y P, predominando el primero.

En 1957, (60) N. Rothstein prosigue estos trabajos y halla relaciones heterogenéticas entre *Shigella dysenteriae* y *L. pomona*. En cambio en 1960, Papachiriacu (61) niega la existencia de tales relaciones.

N. Rothstein y F. Wollman (1959)(62) preparan otra vez el precipitinógeno soluble en agua y el antígeno fijador de complemento, insoluble, por el método de extracción alcohólica. Estudian este último antígeno suerológicamente, mediante microaglutinación, en su

yo hemolítico de Cox de sensibilización de los eritrocitos, y prueba de fijación de complemento al 50% de hemólisis. Demuestran que el antígeno es estable y puede aplicarse ventajosamente para el suerodiagnóstico en hombres y animales. Para bovinos, es mejor el último método mencionado.

M. D. Schneider (63) emplea una técnica de fraccionamiento más perfeccionada para estudiar los distintos antígenos y sus propiedades químicas. Prepara (64) la fracción 1 de *L. bataviae*, *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*. Por hidrólisis y cromatografía de la última halla entre 5 y 7 componentes, algunos de los cuales podrían ser 1(-)arabinosa, d(-)xilosa, 1(-)ramnosa y glucosamina. En las fracciones 1 de los tres suerotipos nombrados, halla pentosas, metilpentosas y DNA. Mediante la espectrofotometría ultravioleta de los productos de una reacción de Dische (B C y R) coloreada, del ácido sulfúrico-sulfhidrilo por ellos empleada, logra una identificación preliminar de ciertos azúcares de la fracción polisacárido de la "fracción 1", hallando cantidades similares aproximadamente tanto de pentosa como de metilpentosa en los 3 suerotipos (65), por lo cual esto no explica las diferencias suerológicas entre ellos.

La fracción 1 es género-específica en pruebas de fijación de complemento, aunque reacciona (como vimos) más intensamente con el suero homólogo. Ensayó entonces una "purificación parcial" sobre ella: precipitando el DNA por alcohol de la solución salina; el componente en solución es designado "etanol-soluble"; a otra porción de fracción 1 añade Cl_2Mg y trazas de $HONa$, precipitando material suerológicamente activo, denominado "insoluble en álcali"; sobre una tercera alícuota añade SO_4H_2 y tungstato de Na, separando el "antígeno precipitado por ácido tungstico". Las tres porciones resultan activas.

Examinando los resultados obtenidos, el autor concluye que la "fracción 1" posee un principio género-específico, asociado con un polinucleótido (y con trazas de proteína) posiblemente desprovisto de actividad. Ese principio es termoestable y no dializable; sería un polisacárido, fundamentalmente tipo pentosano, (como hallare

Hiatt en 1953) similar al somático de los neumococos.

Los trabajos prosiguen, y en 1955 (66) Schneider encuentra que la fracción 1 inyectada al conejo produce antisuero fijador de complemento. Esto no es nuevo pero el autor halla además que ese suero tiene aglutininas altamente tipo-específicas, lo que hizo pensar que la fracción 1 contiene 2 antígenos.

Luego Schneider aplica su marcha de fraccionamiento, cuyos pasos fundamentales son: lavado, desintegración, extracción con alcohol amílico-cloroformo; separación en 3 capas: 1º) fase de solventes con los lípidos (se descarta); 2º) fase acuosa: por diálisis, etc. da la fracción 1; y 3º) una capa interfacial. Esta se separa en: no precipitable por ácido tungstico (Fracción 4) y precipitable por ácido tungstico, que a su vez por tratamiento con alcohol se divide en: soluble en alcohol al 75%: dializado dará la fracción 2, e insoluble: por diálisis nos da la fracción 4.

Los números 1,2,3 y 4 indican cantidades decrecientes de material antigénicamente activo. La fracción 1 contendría aquella parte inmunológica en la cual las determinantes antigénicas están vinculadas químicamente con preparaciones similares de otros suerotipos. Muy probablemente la especificidad de las reacciones de fijación de complemento, así como las reacciones cruzadas del antígeno de fracción 1 se deban a la estructura química del polisacárido. Pero no se excluye que también el aglutinógeno específico de esta fracción pudiera intervenir en una reacción de fijación de complemento.

La fracción 2 parece no contener glucosamina. Contiene menos N, pentosa y deoxihexosa que la fracción anterior, según la reacción de Dische mencionada; habría diferencias entre *L. bataviae*, *L. canícola* y *L. icterohaemorrhagiae* en la composición de esta fracción. Contendría un haptene polisacarídico, que fija el complemento con el suero homólogo, pero reacciona escasamente con sueros anti-fracción 1 y anti-fracción 2, homólogos y heterólogos. Se supone que la actividad suerológica de esta fracción 2 se debe a impurezas de fracción 1.

Las fracciones 3 y 4 fijan débilmente complemento, tal vez por la misma razón. La fracción 3 es fundamentalmente protéica y parece ser un antígeno común denominador. La fracción 4 consiste en material nitrogenado no protéico, como era de esperar.

En 1955, Schneider y McLaughlin (67) aplican la espectrofotometría infrarroja en el rango $2 - 15 \mu$ para el estudio de ciertos grupos químicos funcionales de las fracciones de Schneider. De la interpretación de las complejísimas curvas de absorción resultaría que los datos más notables serían el hallazgo en la fracción 1 de uniones polisacarídicas; en la 2, habría funciones carboxilo ausentes en la anterior; en la 1 hay ácidos nucleicos, ausentes en la 2 y 3. Hay picos comunes a la 1 y 2. En esta última hay indicios de la presencia de un sacárido más complejo, por lo que esta fracción tendría un elevado contenido en azúcares.

El espectro de la fracción 3 indica una proteína común a los distintos suerotipos.

Los autores observan que las diferencias entre los espectros de los distintos suerotipos en las fracciones 1 y 2, que no se alcanzan a interpretar enteramente, puede aclarar las causas de las diferencias y relaciones suerológicas.

En 1958, G. Heyman y G. Siefert (68) estudian los aminoácidos constituyentes de las proteínas y libres de diversas espiroquetas y leptospiras. El alto tenor en aminoácidos (30%) parece característico de las proteínas de las espiroquetas. El cociente RNA/DNA es similar al de las bacterias. Los lípidos se encuentran en un 20%, cifra superior a las encontradas en bacterias.

En 1960, J. van Riel, Marc van Sande y M. van Riel (69) estudian extractos de leptospira mediante microelectroforesis sobre gel de agar. Los microorganismos lavados varias veces se desintegran por sonicación y luego se separan los restos celulares, concentrándose el sobrenadante por ultrafiltración. Se somete a la microelectroforesis sobre agar con un patrón de albumina humana, siderofilina y dextrano despolimerizado. Los ensayos realizados sobre las cepas Wijnberg y Wa Leiden (biflexa) arrojan resultados distintos.

En la India, P.G.Pande, P.G. Sekariah y R.R.Shukla (70) en 1961 realizan el análisis antigénico de las 4 fracciones de Schneider de 4 sub-suerotipos de *L.pomona*, por difusión en agar de los antígenos y anticuerpos. Las fracciones han sido ensayadas en presencia de los antisueros; los sueros inmunes preparados con las fracciones 1 y 2 dan una sola línea con las células enteras homólogas. Pero las fracciones 3 y 4 no dan nada, indicando que están más profundamente ligadas a la célula.

Otras experiencias indican que las fracciones 1, 3 y 4 son comunes a todos los subtipos en un suerotipo, mientras que la 2 parece determinar las diferencias. Los autores han revelado las precipitinas en las mismas condiciones

Sobre la discutida patogenicidad de ciertas *Leptospira biflexa*

En base a la identidad morfológica y algunas observaciones experimentales, ciertos autores sostuvieron, sobre todo en el pasado, que no existe diferencia alguna entre las leptospiras saprófitas y patógenas, y que las primeras pueden transformarse en las segundas, sea directamente, pasando del agua al organismo de los animales o del hombre, o indirectamente, pasando a través de un animal portador, o modificándose bajo la acción de condiciones ambientales particulares (2)

Esta tesis fue sostenida especialmente por Zuelzer, Baermann, Sardjito, Hermann, Soesilo y - durante cierto tiempo - Uhlenhuth. Se basaba en el resultado de infecciones experimentales de cobayos con cepas de leptospira acuícola, que se habrían tornado suerológicamente iguales a las cepas patógenas.

Estos resultados no han podido ser reproducidos por varios investigadores que han estudiado este problema (Schüffner, Van Thiel, Mochtar, Dinger y Verschaeftel, Shiga y Kitaoka), y la noción de la estabilidad del carácter antigénico y del poder patógeno fue afirmándose, por lo que hoy pocos son los que sostienen la hipótesis de Zuelzer.

Baermann y Zuelzer, investigando la posibilidad de "transforma-

mación" (Umwandlung), observan el desarrollo de un cuadro típico de Weil en el cuarto pasaje en cobayo de la cepa acuícola RG1. Del último animal, dichos autores recuperan una cepa distinta. Con otra cepa acuícola (Erlangen) Uhlenhuth y Grossmann obtienen resultados similares.

La cepa W.A.Z. no adquirió virulencia en cobayo, y fue inoculada a una mujer; un cobayo inoculado con sangre de esta mujer al 6º-7º-8º día, murió con ictericia, y la cepa recuperada no era aglutinada por el suero de la persona inoculada, que en cambio aglutinaba la cepa W.A.Z.

Casi todas las cepas acuícolas estudiadas por Baermann y Zuelzer (RG1, RGV, Erlangen, WaA, Sarang Gitting I, II y III, Petoenbocken, W.A.Z.) se "transformaron" en virulentas para el cobayo; otras cepas, se "transformaban" en Sumatra pero no en Europa.

Van Thiel explica los resultados de Zuelzer suponiendo un error en la identificación de las cepas, o una epidemia de leptospirosis entre los animales de experiencia.

Sin embargo, debemos considerar varios hechos vinculados con el problema. Uno es la demostración de que en ciertas circunstancias también las leptospiras modifican su constitución antigénica, como hemos visto ya (53, 54, 55, 56).

Por otra parte, sin que pretendamos discutir el tema, sabemos que ciertos suerotipos originariamente considerados patógenos, y a veces causantes de cuadros clínicos muy graves en el hombre (andaman A) (6) fueron considerados por los investigadores húngaros Fúzi y Csóka (71) y por Cacchione y colaboradores (72) en nuestro país, dentro de las *Leptospira biflexa*. Sin embargo, han aparecido nuevos casos fatales o no (73, 74) en los que el agente causante sería la *L. andaman A*.

Como se muestra en la última clasificación de leptospiras propuesta, este suerotipo, junto con *L. semaranga*, no figura ya entre las leptospiras patógenas.

La cepa tipo. CH 11, fue aislada por Taylor y Goyle (75) en 1931 durante un brote epidémico en las islas Andaman.

La cepa Rat Semarang 173 (*L.semarangensis*) fue aislada en 1937 de una rata en Java por Sardjito y Mochtar (76).

Dymowska en 1960 (77) y luego Babudieri y Dymowska en 1961 (78) hallan que una cepa aislada en 1948 en Polonia probablemente de la sangre de un paciente por Chrominski (cepa Lublin) es antigénicamente idéntica a la R. S. 173, suerotipo que hasta ese momento no había apareado en Europa.

En la Unión Soviética, Tiérskij halla en 1960 (79) que la cepa BSH, acuícola aislada de un pantano en la región de Moscú en 1931 "posee antígenos comunes" con la R.S.173, e informa que han sido aisladas otras leptospiras idénticas a la cepa BSH, tanto del agua como de los animales y del hombre, en distintos puntos de la U.R.S.S.

La *L.semarangensis* también es considerada *L.biflexa* por Fúzi y Csóka (71) y por Cacchione y colaboradores (72).

En 1951, Czekalowski y Horne (80) investigando tres casos de "cistitis abacteriana aguda", logran aislar de uno de ellos una cepa de *Leptospira*. La describen como "dudosamente patógena", no obstante, porque no exhibe propiedades patógenas inoculada al cobayo. En 1954, Czekalowski y McLeod (81), estudian esta cepa, llamada "*Leptospira leeds*", hallando que no tiene relación antigénica con los tipos de leptospiras patógenas frecuentes en Europa. Sin embargo, el suero anti-leeds dá reacciones fuertemente positivas con viejas cepas patógenas, en tanto que otras cepas del mismo tipo no reaccionan. No resulta patógena ni aún inoculando grandes cantidades.

La cepa crece mejor que las patógenas en medio de Fletcher preparado con distintas concentraciones de orina, lo que hace expresar a los autores que "bien puede ser un agente causal de cistitis abacteriana aguda".

Fúzi y Csóka en 1960 (82,83) estudian las relaciones antigénicas de esta cepa con los suerotipos patógenos conocidos y registrados, realizan pruebas de patogenicidad con métodos más sensibles, y comparan las propiedades biológicas de las cepas con las de los suerotipos patógenos y con las de leptospiras de agua, empleando los ensayos del SO_4Cu y de la yema de huevo, de los propios autores.

No hallan ninguna acción patógena ni relación antigénica con las cepas patógenas, nuevas o viejas. Por sus propiedades biológicas las ubican en el grupo de *L. biflexa* pero sin excluir su pertenencia a las supuestas leptospiras comensales. No juzgan aclarado el papel de la leptospira en las cistitis mencionadas.

Medios de cultivo

Las leptospiras no desarrollan en los medios usuales empleados en microbiología. Los primeros resultados positivos, si bien poco satisfactorios, se lograron con un medio semisólido utilizado por Noguchi para cultivar *Borrelia recurrentis*, en anaerobiosis.

Se hicieron diversos intentos añadiendo flúidos naturales del organismo, como líquido ascítico, suero de diversos animales, etc., en soluciones salinas; el paso fundamental fué dado por los franceses y alemanes al emplear suero de conejo en condiciones semianeróbicas. Reiter y Ramme (84) propusieron en 1916 el uso de 10 a 20% de este suero, en solución fisiológica al 8,5 ‰, con trazas de hemoglobina. Este medio se usa aún hoy en el Instituto Pasteur de París, cubriéndolo con una capa de vaselina líquida; otros autores le han introducido variaciones.

Uhlenhuth (85) empleó en 1917 suero de conejo diluido 1:30 en agua de grifo. Desde entonces, el suero de conejo, preferiblemente algo hemolizado, resulta prácticamente insustituible. Es conveniente realizar un "pool" de varios sueros, pero como el de algunos conejos puede inhibir el desarrollo, deben ensayarse por separado antes de mezclarlos. A veces el inconveniente se debe a la presencia de aglutininas, pero en ocasiones se produce sin que éstas sean demostrables (6).

En 1922 y 1923, Vervoort (86) obtuvo resultados más uniformes al standardizar los componentes del medio, y demostró la conveniencia de añadir pequeñas cantidades de peptona. Señaló la fundamental importancia del pH, siendo el rango 7,2 a 7,4 el más favorable.

Estos resultados de la escuela holandesa han sido adoptados por casi todos al introducir en los medios las soluciones buffer.

La mayoría de los medios contiene peptona, recomendándose la marca Witte. No obstante, puede reemplazarse perfectamente por otras, como Difco proteosa N° 3, Difco Neopeptona, Fairchild, etc.-

Czekalowski, McLeod y Rodican, en 1954, (87) hallaron que incluso dentro de una misma marca había variaciones notables en la aptitud para mantener el desarrollo entre partidas diferentes de peptona, por lo que se recomienda efectuar siempre ensayos previos con cada nueva partida.

Frecuentemente los eritrocitos hemolizados, en dosis pequeñas, favorecen el desarrollo. Czekalowski, McLeod y Rodican (87) explican este hecho fundándose en la ausencia, según ellos, de catalasa en las leptospira (88); esto concordaría con el efecto nocivo que ejerce la luz sobre estos microorganismos.

La temperatura óptima para el desarrollo es 30-32°, haciéndolo sin embargo bien desde 25° C. No obstante, para cultivos en primer aislamiento se recomienda incubar a 37° C.

La composición de los medios de cultivo es en rigor aún empírica, y van introduciéndose modificaciones a medida que se adquieren nuevos conocimientos sobre la fisiología y el metabolismo de las leptospiras, sus requerimientos nutritivos, factores de desarrollo y activadores. Así, el medio de Stuart (1946)(89) no contiene peptona, pero en él la asparagina y la glicerina son los principales complementos nutritivos que la reemplazan; el medio de Chang (1947)(90) contiene en cambio Bacto-triptosa y polvo de extractos de hígado, y en lugar de suero de conejo lleva suero de caballo.

El medio de Savino y Rennella (91) posee suero de carnero y hematina, señalando los autores que esta última sería un factor de crecimiento y que el autolizado de levadura y el hidrolizado de caseína favorecen marcadamente el desarrollo. Está comprobado que el suero de conejo es el más conveniente, pero éstos y otros investigadores han empleado suero de animales grandes por su más fácil

obtención en grandes cantidades.

Los medios de empleo más frecuente en la actualidad son el de Reiter y Ramme, Vervoort, Fletcher, Stuart y Korthof, con o sin modificaciones de la fórmula original. Este último, con las modificaciones con que lo emplea Babudieri, es muy conveniente por su preparación fácil y relativamente económica y es adecuado para mantenimiento de colecciones, preparación de antígenos y aislamiento de cepas. Es el adoptado por este Instituto.

Al efectuar repiques es conveniente realizar inóculos masivos, transfiriendo al medio fresco alrededor del 10% de su volumen tomado del cultivo viejo con pipeta Pasteur.

Medios sólidos

Durante mucho tiempo, los intentos de desarrollar *Leptospira* en medios sólidos no dieron resultados satisfactorios en la obtención de colonias aisladas de *Leptospira*. Así Woratz (92) describe en 1952 el crecimiento de leptospiros en agar inclinado, pero es muy dudoso que el desarrollo haya ocurrido como colonias aisladas.

Cox y Larson en 1957 (93) describen un medio sólido en el que obtienen colonias aisladas de leptospiros. El medio es pobre en sales, y contiene suero de conejo y hemoglobina. La concentración de agar, (1%) es crítica. En estos medios no se ven fácilmente las colonias de *Leptospira*, por lo que Armstrong y Goldberg en 1960 (94), estudiando su morfología, las "revelan" mediante oxalato de parafenilendiamina. Los autores discuten diferentes factores que influyen en el desarrollo.

Stalheim y Wilson (95) prosiguen en 1963 estudiando la morfología de las colonias.

En 1959, Kirschner y Graham (96) describen otro medio sólido para uso en tubos, por punción; manifiestan que en placas los resultados no son tan satisfactorios.

M. Aktan y S. Ertuğrul (97) solidifican medio de Korthof adicionado de hemoglobina, mediante 1,7% de agar.

La importancia de los medios sólidos escapa a toda posible

discusión, pero no podemos dejar de señalar que no es fácil obtener con ellos los resultados descritos en la literatura, al menos en lo que se refiere a la purificación de cultivos contaminados. Será necesario realizar nuevas pruebas y familiarizarse con su empleo. Yanagawa, Hiramune y Fujita (98) estudian en 1963 la influencia del CO₂ en el desarrollo en estos medios, (reclamando la prioridad en la descripción de colonias en medio sólido para Fukushima (1927)) y determinan que es favorable un 0,04% ó 1% de CO₂, no desarrollando en ausencia de éste, ni en presencia de concentraciones mayores (10% - 20%). Vinculan el fenómeno al carácter microaerófilo de las leptospiras.

Los medios para leptospiras saprófitas

Las leptospiras acuícolas casi nunca son tan abundantes en el agua como para poder proceder al aislamiento sin enriquecerlas previamente; después se purificará el cultivo contaminado obtenido.

Algunos de los medios propuestos, como el de Vagedes (infusión de levaduras), Kitaoka (hilos de paja de arroz) e Hindle (heces humanas), hoy sólo tienen posiblemente interés histórico. Otros, como el de yema de huevo de Zuelzer, se emplean actualmente. Este medio es una modificación del de Damon y Hampil (99), adicionando buffer de fosfatos y verde brillante para limitar el desarrollo de otros gérmenes. Kolochine-Erber (100) reemplaza el verde brillante por sulfanilamidas.

Estos medios no contienen suero, pero los gérmenes asociados producen metabolitos que obran como factores de crecimiento. En ellos desarrollan las leptospiras saprófitas, pero no las patógenas.

No creemos adecuado transcribir aquí una larga lista de los diversos medios de cultivos, líquidos, semisólidos y sólidos, con sus preparaciones y variantes, pues pueden hallarse en varias otras fuentes (2, 6, 44, 100).

Examinaremos muy brevemente los resultados más importantes alcanzados en el cultivo de leptospira en medios sintéticos y semi-sintéticos al tratar del metabolismo de estos microorganismos.

Nociones sobre caracteres fisiológicos y metabolismo

Los requerimientos nutritivos de las leptospiros, sus factores de crecimiento y en especial el metabolismo de estos microorganismos han sido estudiados por diferentes investigadores, llegando frecuentemente a conclusiones no coincidentes. No se posee aún un medio de cultivo de composición químicamente definida que permita un desarrollo abundante de estos microorganismos, para abordar de modo sistemático el problema.

El pH y la temperatura

Hemos mencionado ya la gran importancia que tienen el pH y la temperatura para el cultivo de las leptospiros. Según Mailloux y Kolochine-Erber (100) sólo desarrollan entre pH 7,2 y 7,6; las saprófitas sobreviven entre 5,8 y 7,8 y las patógenas entre 7,4 y 8,6. Otros autores (101, 102, 91) dan cifras ligeramente distintas pero todos concuerdan en que el desarrollo y la supervivencia de las leptospiros requieren un pH neutro o levemente alcalino.

Ellinghausen (101) halla que la temperatura óptima está entre 28,5°C y 29,5°C, y que a menores temperaturas el desarrollo es más lento. En cambio, a 32°C - 37°C comienza más rápidamente pero la división no se favorece. Hindle (cit. por (2)) halló en aguas termales una leptospira que crecía a 50°C - 60°C y no a 30°C; puede considerarse como un caso excepcional que debe comprobarse.

Importancia del oxígeno. La respiración y factores que intervienen.

Las leptospiros son aerobias estrictas, o más precisamente microaerófilas. Ya en 1918 Noguchi (103) señala que el desarrollo tiene lugar en las capas superiores del medio. En 1932 Dinger (104) observa en medio semisólido un tenue disco blanquecino a 10-12 mm. bajo la superficie, formado por una gran cantidad de leptospiros. Fuera de esta zona de aerobiosis óptima, no se aprecia desarrollo.

Czekalowski, McLeod y Rodican encuentran en 1953-1954 (87,88) el fenómeno de Dinger en medios líquidos con todas las cepas examinadas; la zona de desarrollo de las patógenas sería más estrecha y alejada de la superficie que la de las saprófitas, y deducen que las

leptospiras requieren oxígeno a una presión algo menor que la de este gas en la atmósfera. Hay muy poca diferencia entre suerotipos.

En 1947, Chang (105) no logra medir consumo de oxígeno mediante la técnica de Warburg; pero Marshall en 1949 (106) aplicando el mismo método lo mide, utilizando suspensiones más concentradas de leptospira. El consumo es marcadamente estimulado por el suero de conejo, pero no por hidratos de carbono, aminoácidos, hemoglobina o peptona.

Fulton y Spooner en 1956 (107) estudian en detalle el metabolismo de la *Leptospira icterohaemorrhagiae* en medio de Korthof, calculando un tiempo de generación de 58 a 68 horas en la fase logarítmica. (Este valor depende de las condiciones, y así Larson y Edwards en 1958 (108) lo estiman en 11 horas en otro medio de cultivo).

Debido a la baja actividad metabólica y al lento desarrollo, no hay grandes cambios químicos en el medio de cultivo. Así, durante 24 días no se observa variación del pH ni utilización de glucosa. Sólo aparecen pequeñas cantidades de ácidos grasos de bajo peso molecular. En suspensiones concentradas, observan consumo de O_2 y producción de CO_2 lenta pero constante.

El constituyente del medio que estimula la respiración resulta ser principalmente el suero de conejo. No es reemplazable por otras sustancias ensayadas, que se muestran inactivas, como la glucosa, glicerol o ácidos grasos. El hidrolizado de caseína y algunos aminoácidos sólo producen estímulos transitorios.

Los autores encuentran que el constituyente activo es la proteína sérica. Demuestran un sistema citocromo-c y comprueban su participación en la respiración pues ésta es interferida por azidas y cianuro; no interfieren en cambio malonato, arseniato ni fluoruro, que inhiben enzimas del metabolismo de la glucosa.

Azúcares

Poco se conoce actualmente sobre la fermentación de azúcares y alcoholes, y además los resultados son dispares. Según Chang (105) y Marshall (106), las leptospiras no utilizan azúcares.

Supniewski y Hano (109) hallan que las leptospiras cultivadas

en medio de Korthof atacan l-arabínosa, glucosa y galactosa. La sacarosa es levemente hidrolizada, y la fructosa y manosa muy poco afectadas. Una serie de otros azúcares no son empleados, como tampoco el ácido úrico, nitratos, fosfatos, ácido láctico y compuestos orgánicos fosforados. La urea es descompuesta con alcalinización del medio.

Savino y Rennella (91) ensayan 22 hidratos de carbono, de los que sólo la dextrina favorece el desarrollo.

Proteínas, aminoácidos, vitaminas

Respecto a las proteínas, aminoácidos y vitaminas, se debe puntualizar que los resultados han sido en general obtenidos en medios que contienen suero o sus fracciones, y que el número de cepas estudiadas es escaso.

Rosenfeld y Meridian (110) observan que el ácido nicotínico, tiamina, nicotinamida, riboflavina, piridoxina y ácido ascórbico estimulan el crecimiento de *Leptospira canícola*.

Savino y Rennella (91) confirman en general los resultados anteriores, excepto para el ácido ascórbico, que hallan inactivo, así como el ácido pantoténico. Ensayan además 15 aminoácidos, encontrando favorables únicamente la asparagina y el ácido aspártico; también provoca un mejor desarrollo el ácido pimélico, y no en cambio una serie de ácidos orgánicos, glicerina, colesterol y sales de Fe, Co, Cu, Zn y Mn.

En 1950, Greene, Camien y Dunn (111) estudian el crecimiento de leptospiras en un medio-base salino al que añaden peptona y suero dializado. Se obtiene desarrollo, siendo eliminable la peptona pero no el suero, que no se puede sustituir por una mezcla de aminoácidos y vitaminas, resultado que ya Chang había obtenido anteriormente. Cultivan *Leptospira canícola* en medios con 19 aminoácidos, vitaminas, bases purínicas y pirimidínicas, minerales y l-glutamina, pero añadiendo sueroalbúmina de conejo; también ensayan la de otros animales.

La sueroalbúmina de conejo se muestra activa para el crecimiento del microorganismo, y éste es estimulado por arginina, ácido as-

pártico, prolina y ácido glutámico, aunque no la pueden reemplazar. Otros aminoácidos no favorecen; la única vitamina activa es la tiamina, y hay desarrollo de varios suerotipos patógenos en un medio constituido por solución Ringer, buffers, tiamina, asparagina y sueroalbúmina de conejo.

En 1959, Gerhardt y Ball (112) estudian la utilización de aminoácidos por *Leptospira canicola* en medio de Schüffner. Algunos son utilizados, pero también se observa un aumento de aminoácidos libres en el medio estéril, incubado a 37° C durante 48 horas por degradación lenta de las proteínas en el medio.

En 1960, Johnson y Wilson (113) estudian la influencia de la albúmina, globulina y suero total ultrafiltrado en un medio base, para el desarrollo de *Leptospira pomona*. La albúmina es la fracción más activa. Puede mantenerse el desarrollo en medio con albúmina, globulina autoclavada y ultrafiltrado, o también con almidón soluble, sueroglobulina, ultrafiltrado y hematíes lisados.

En 1962, Johnson y Gary (114) observan que *Leptospira pomona* crece mal con suero de conejo dializado, mejorando por adición de ultrafiltrado. Intentan sustituir éste último, observando la acción favorable de la l-asparagina y de la sal de amonio del ácido pirro-lidocarboxílico. Otros aminoácidos tienen débil acción. Salvo la asparagina, los aminoácidos sirven como fuente de N, así como las sales de amonio. La urea es una buena fuente, y junto con el $ClNH_4$ puede igualar también a la asparagina.

La tiamina es la única vitamina esencial también para estos autores. En cambio Markovetz y Larson (115) hallan reacciones de transaminación en *Leptospira biflexa*, y piensan que los aminoácidos pueden servir también como fuente de energía, pues pueden ser metabolizados y existe un sistema citocromo-c en las leptospiras.

Lípidos, lipasas y su significado

Fulton y Spooner (107) estudian en sus trabajos sobre respiración la influencia de los ácidos palmítico, esteárico y oleico, sin lograr identificar el estimulante. La respiración aumenta con fosfolípidos impuros de yema de huevo, posiblemente por la presencia

de ácidos grasos en el fósfolípido, que actuaría en sí como detoxificante.

En 1957, Helprin y Hiatt (116) hallan que la proteína del suero suministra ácidos grasos en forma no tóxica, y que en presencia de la fracción V detoxificante del plasma humano la respiración es aumentada por trazas de algunos ácidos grasos.

Woratz (1957) (117) e Ivler (1960) (118) observan que los ácidos grasos promueven el desarrollo. El primero emplea un medio con gelatina y caseína digerida por tripsina.

Kemenes y Lovrekovich (1959) (119) observan una enzima que ataca grasas, en particular sebo de buey. Las cepas activas son en especial las virulentas; al perder la virulencia ya no atacan las grasas. Los autores suponen que este sistema lipásico sería también el agente que produce opacidad en medios con la yema de huevo. Los suerotipos con actividad lipásica notable provocan ictericia y hemorragia en los tejidos.

En 1960, Parnas, Košlak y Krukowska (120) hallan actividad lipásica en algunas cepas patógenas y no en otras.

Bertok y Kemenes (1960) (121) hallan las lipasas en patógenas y saprófitas, aunque los sistemas serían distintos. Las cepas que atacan grasas animales actúan sobre la tributirina; las saprófitas actúan sobre ésta pero tienen menor acción sobre las grasas animales en general. La tributirinasasa aparece en los cultivos líquidos, y está relacionada con la hemotoxina pero no siempre con la virulencia.

Kmety y Bakoss (122) en 1961 hallan que la producción de lipasa y hemolisina en diversas cepas no está vinculada entre sí ni con la virulencia ni son características para cada suerotipo.

En 1953 Mifuchi y Kawata (123) proponen sustituir el suero de conejo del medio de Korthof por lecitina de yema de huevo para el cultivo de *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Mifuchi, Hosoi y Yanagihara (124) estudian en 1961 los lípidos de la yema de huevo extraíbles por acetona que, según ellos, pueden reemplazar al suero de conejo para el cultivo de *Leptospira canicola*.

Mediante fraccionamientos hallan dos grupos activos: uno contendría "ácidos grasos no saturados y glúcidos" y el otro, fosfolípidos.

En 1952 Woratz (92) cultiva *Leptospira canícola* en un medio compuesto por minerales, tiamina, asparagina y peptona, al que añade productos de extracción alcohólica de suero de conejo, corazón de buey y yema de huevo. Estos productos son termoestables y favorecen el desarrollo.

En medios con gelatina, la adición de ácido esteárico, palmítico, oleico o "Tween 80" es favorable, pero en ausencia de gelatina no hay crecimiento.

En cambio en 1961, Vaneseltine y Staples (125), trabajando con un medio de composición definida químicamente, hallan que el extracto clorofórmico de suero de conejo tiene acción desfavorable, y en medio semisólido definido el ácido oleico y el "Tween 80" permiten la multiplicación de leptospiros en ausencia de suero, a profundidades variables según la concentración de ácido oleico.

Un resumen de trabajos anteriores sobre hemolisina, catalasa, oxidasa, lipasa y gelatinasa, así como estudios sobre coagulasa y ureasa es publicado en 1962 por Parnas, Krukowska y Nowac (126). Este trabajo se refiere a un número grande de cepas: 61, más 18 modificadas antigénicamente en laboratorio. En estas últimas también se modificó la actividad hemolítica, no así la lipásica.

Vogel y Hutner (127) logran un medio químicamente definido aunque complejo, en el que desarrollan varias cepas patógenas de *Leptospira*, sustituyendo el suero por ésteres de ácidos grasos: monooleína, monoestearina, palmitato de metilo y oleato de metilo. La tiamina es indispensable, y la adición de ácido nicotínico, pantoténico, p-hidroxibenzoico, vitamina B-12 y putrescina acelera o aumenta el desarrollo. El ión ferroso sustituye a la hemina en condiciones determinadas y se vincula a la catalasa; las cepas que no posean esta enzima pueden requerir hemo externo. Por último, el medio contiene aminoácidos, sales y otras sustancias.

Será necesario estudiar y perfeccionar medios de este tipo pa-

ra lograr desarrollos iguales o mejores que los obtenidos con medios a base de materiales naturales complejos, como suero; su importancia trasciende de la investigación bioquímica sobre estos microorganismos, pues permitiría preparar mejores antígenos, vacunas y medios para aislamiento y usos generales.

Algunos factores de desarrollo

La influencia favorable de los eritrocitos hemolizados en los medios de cultivo para leptospiras es un hecho perfectamente conocido, descrito por varios investigadores. Entre nosotros, Savino y Rennella (91) hallan que la hematina es un factor indispensable.

Faine (128, 129, 130) estudia el desarrollo en medio de Kort-hof preparado con suero en el que se ha evitado la hemólisis, hallando que es necesaria una fuente de hierro. La adición de éste al medio disminuye el número de leptospiras necesario en el inóculo para permitir el desarrollo. Ensayando como fuentes de hierro hemolizados de glóbulos rojos de conejo, carboxihemoglobina, metahemoglobina, hematina y Cl_2Fe , halla que estos dos últimos son menos activas. Además demuestra la existencia de una catalasa intracelular en leptospiras patógenas, de pH óptimo 7 y temperatura óptima $37^{\circ} C$. No halla, por el contrario, peroxidasa.

Steytler (131) estudia la influencia de la hemoglobina, hierro ferroso y férrico en cepas patógenas, encontrando que el férrico influye sobre el crecimiento y la sobrevivencia, más que sobre la respiración.

En la literatura se ha mencionado en varias ocasiones el hecho de que ciertos microorganismos contaminantes, hongos en particular, ejercen acción favorable sobre las leptospiras. Un ejemplo reciente es el hallado por Ezhova (132) en una cepa de *Penicillium*.

Babudkeri y Zardi (133, 134, 135) observan que en el medio de Zuelzer desarrollan leptospiras cuando se siembra en él la muestra de agua contaminada, pero no hay desarrollo si en el medio estéril se siembra un cultivo puro de *Leptospira biflexa*. Por tanto, suponen que el factor responsable de esta diferencia es un metabolito de

otros microorganismos asociados. Este resulta ser la cianocobalamina, que como veremos luego, permite según los autores el desarrollo de las cepas acuícolas en ausencia de suero y peptona. Por otra parte, la cianocobalamina permite reducir la cantidad necesaria de suero en el medio de cultivo de Korthof empleado para usos generales.

Estudiando cepas acuícolas, hallan que los llamados factores similares B y C, que pueden sustituir a la cianocobalamina para muchos microorganismos utilizados habitualmente en el dosaje de ésta, son incapaces de reemplazarla para las leptospiras.

Tampoco es activa la metionina, pero sí la timidina. La adenina y el uracilo, solos, tienen acción limitada. La guanina es activa, y potencia además la actividad de la timidina y de la cianocobalamina, las que por el contrario son inhibidas por el uracilo y más aún por la adenina. En cambio, adenina y uracilo juntos no inhiben.

Otros autores han observado que ciertas sustancias vinculadas al reino vegetal ejercen acción estimulante sobre las leptospiras. Así, Ashmarin (136) halla que el indolacetato de potasio, hormona vegetal, activa el desarrollo y estimula cepas que se hallan en vías de degeneración.

Efecto de agentes físicos y químicos

Las leptospiras son lábiles frente a condiciones adversas de temperatura. Chang, Buckingham y Taylor (137) hallan que una suspensión en agua destilada de *Leptospira icterohaemorrhagiae* muere ya a 45° C en 30 min., y a 60° C en 10 segundos; Babudieri halla otros valores. A temperaturas bajas, sin llegar a la congelación, la sobrevivencia es mayor que a 31-32° C.

Las leptospiras pueden ser congeladas, según algunos autores, (Kathe, Rimpau, Uhlenhuth, en (2); Shigekawa y Stockton, en (100)) siempre que luego el descongelamiento no sea brusco, e incluso se ha descrito que soportan la temperatura del aire líquido (138). Brunner (en (2) y (100)) halla que permanecen vivas a 2° C, y durante breve tiempo - a -30) C. No obstante, el congelamiento daña un gran número de leptospiras, según observaciones realizadas me-

diante microscopía electrónica (2).

El glicerol, que de ordinario les es tóxico, ejerce una acción protectora durante la congelación.

Annear (139, 140, 141) se ha ocupado del problema de la conservación de cepas por desecación, intentando simplificar las técnicas y mejorar los resultados inconstantes obtenidos. La conservación es más efectiva a baja temperatura (4° C).

En condiciones habituales, las leptospiras no resisten la desecación. Otsuka y Manako (142) aplican la liofilización a las leptospiras, obteniendo también por conservación a baja temperatura (congeladora) mejores éxitos. La presión osmótica influye sobre las leptospiras. Babudieri (143) halla que las soluciones hipertónicas producen rápidamente degeneraciones de los cuerpos espiroquéticos, siendo más lenta la acción de soluciones hipotónicas. De hecho, algunos medios de cultivo son hipotónicos y se emplean corrientemente, como el de Korthof. En cambio, Savino y Rennella (91) determinan que el óptimo de presión osmótica es 1,69 atm.-

La luz, con algunas raras excepciones, ejerce un efecto nocivo sobre las leptospiras.

El efecto del pH se trata en otras secciones del presente trabajo. Los ácidos y alcalis fuertes destruyen rápidamente las leptospiras, así como los halógenos, aún en muy pequeña cantidad (137), que son así eficaces en el tratamiento de aguas (144).

Las leptospiras son asimismo muy sensibles a la acción de detergentes (137) y sales biliares (143).

La pepsina, y la papaína más lentamente, destruyen el protoplasma y dejan libre el axostil (143).

Las sales de Cu ejercen una acción inhibitoria del desarrollo de las leptospiras en cultivos; hoy se sabe que existe una diferencia en la tolerancia al SO_4Cu entre las cepas saprófitas y patógenas, de acuerdo a Fúzi y Csóka (145), lo cual ha servido a los autores para elaborar una prueba diferencial.

Diferencias entre leptospiras patógenas y biflexas.

La determinación tiene importancia taxonómica y también presenta un problema diagnóstico, al cultivar cepas de diferentes materiales, inclusive humanos.

El criterio de patogenicidad para animales de laboratorio no puede considerarse un método seguro de diferenciación, pues la virulencia de una cepa puede perderse después de algunos pasajes en medios de cultivo (27, 146). Para ello se recurre entonces a métodos biológicos basados en diferencias de requerimientos nutritivos o de tolerancia a distintos agentes. Trabajos recientes hallan también diferencias netas de ciertas actividades enzimáticas.

El desarrollo en medio de Hindle (147), de 1925, ha sido empleado como método de diferenciación en algunas oportunidades (27). Probablemente otros medios empleados para enriquecimiento de leptospiras acuícolas también darían resultados similares. Dicho medio de Hindle consiste en desleir 1-2 g de heces humanas en 20ml de agua (cuando se desea aislar leptospiras, el agua es la muestra a examinar), en una caja de Petri. Incubado a 25-30° C se observa ya después de 10 días un desarrollo abundante de leptospiras acuícolas. Las patógenas no desarrollan (1, 6).

Otro método aprovecha la mayor resistencia de las leptospiras acuícolas a la acción de sales metálicas, en particular el cobre. Fízi y Csóka (145) elaboran una prueba de diferenciación, preparando medio de Korthof y solución de SO_4Cu al 1% en agua destilada. Esta solución, esterilizada y de reciente preparación, se añade al medio de cultivo en dilución final 1:1.000, 1:10.000, 1:100.000, y 1:1.000.000 para la reacción de orientación. En estas diluciones se siembran por duplicado las cepas a examinar, llevando paralelamente controles de cepas conocidas patógenas y biflexas. Se examinan los desarrollos al microscopio de fondo oscuro después de 7 días de incubación a 30°.

La prueba ha sido empleada entre nosotros por Cacchione y colaboradores (72) con resultados satisfactorios : las cepas patógenas no desarrollan en concentraciones de 1:100.000 ó mayores, en tanto

que todas las saprófitas lo hacen desde 1:40.000

Babudieri y Zardi (133, 134, 135) estudiando el metabolismo de las leptospiras y la acción de la cianocobalamina como factor de crecimiento, halla tres tipos de leptospira respecto al desarrollo en medio de Korthof privado de suero y peptona, pero con ácido nicotínico (1 µg/ml), y cianocobalamina (1 mg/ml).

Un primer tipo, que comprende todas las patógenas, no desarrolla en tal medio; un segundo, que abarca casi todas las saprófitas, desarrolla al menos durante 7 pasajes, y un tercer grupo, constituido por las cepas Patoc 1 y Sao Paulo (biflexas), desarrolla también sin vitamina B-12.

Es necesario lavar previamente los microorganismos para evitar arrastre de suero y peptona del medio anterior.

Posteriormente, Mailloux y Kolochine-Erber (148) estudian el desarrollo de leptospiras en un medio basado en el de Stuart, pero sin suero, que sólo contiene sales, aminoácidos y vitamina B-12. Observan que las leptospiras acuícolas se mantienen por lo menos durante 14 pasajes, y que las patógenas o parásitas no desarrollan, desde el primer momento.

Ambos métodos han sido empleados también entre nosotros por Cacchione y colaboradores (72), quienes sin embargo observan una disminución mucho más rápida del desarrollo, y después del 3^{er} pasaje prácticamente no hallan leptospiras. Por otra parte, estos métodos resultan mucho más laboriosos que el del SO₄Cu.

Fízi y Csõka (146) proponen un método rápido para la diferenciación, basado en un ensayo de oxidasa, añadiendo 0,1 ml de solución fresca de p-fenilendiamina a 4 ml. de cultivo de 8 - 14 días de incubación a 30° C, en medio de Korthof. Luego de incubar a temperatura ambiente, a la luz, durante 45 min., se observa que las patógenas exhiben color marrón rojizo pálido, y las biflexas, marrón oscuro o marrón negruzco.

Los mismos autores, (149), proponen otro ensayo diferencial, basado en la diferente velocidad con que las cepas patógenas y saprófitas atacan un medio que contiene 5% de yema de huevo y agar,

empleado para la investigación de fosfolipasas. El medio es atacado, con formación de turbidez y película, por leptospiras saprófitas en 48 horas, en tanto que las cepas patógenas demoran en hacerlo por lo menos 4 ó 5 días, y frecuentemente mucho más tiempo.

El ensayo se efectúa añadiendo 2 ml de cultivo de leptospiras de 5 días de incubación a 30° en medio de Korthof, a 1 ml de medio con yema, e incubando a 30° C. Se realizan controles con cepas conocidas y también con medio de Korthof estéril, así como sin añadido alguno.

Otras diferencias halladas fueron descritas por Pentek-Juhász (150); en cultivos viejos de cepas biflexas se halla una sustancia hemolítica para los glóbulos rojos de ratón. El autor indica, sujeto a posterior confirmación, que ello podría ser base para diferenciar leptospiras saprófitas de patógenas virulentas o avirulentas.

Además, Bertok y Kemenes (121), estudiando los sistemas lipásicos de las leptospiras, en particular la tributirinasasa, hallan profundas diferencias entre las patógenas y saprófitas.

No sabemos que estas diferencias hayan encontrado aplicación práctica con propósitos diferenciales.

Obtención de leptospiras de aguas

Las leptospiras se hallan muy difundidas en ciertas aguas, y se han empleado diversos métodos para la obtención de estos microorganismos.

Si se siembran muestras de agua en medios para leptospira, se obtendrán siempre cultivos contaminados con otros microorganismos. Con medios que permiten el desarrollo de leptospiras patógenas, no siempre pueden obtenerse resultados satisfactorios, pues las contaminaciones frecuentemente impiden o inhiben el desarrollo de las leptospiras y suelen conducir a la pérdida del cultivo. En cambio, como hemos visto en el capítulo sobre medios de cultivo en general, se han propuesto varios medios especiales para aguas, en los que no desarrollan las leptospiras patógenas, y sí lo hacen, en cambio, las saprófitas; generalmente el más empleado hoy es el de Zuelzer, y será descrito en detalle luego por haber sido utilizado también en el presente trabajo. Referencias originales a otros medios pueden hallarse en (147, 151, 152, 153, 154).

Otros métodos de aislamiento de leptospiras patógenas y saprófitas de las aguas emplean animales, en particular el cobayo. Según Austoni, (2), el aislamiento por cobayo de aguas infectadas no debe realizarse mediante la inoculación intraperitoneal, del modo usual, es decir, esperando el desarrollo de la leptospirosis, pues es casi inevitable que el animal muera antes por peritonitis séptica; los casos en que tal método dió resultados positivos podrían considerarse como debidos a escasez de gérmenes contaminantes.

Probablemente esta opinión no es compartida por todos, puesto que Alexander y colaboradores (155) en 1962 emplean esa técnica para el aislamiento de una cepa (Grand River) en un foco de leptospirosis humana.

En cambio, puede intentarse el aislamiento, mediante la técnica de "filtración rápida in vivo" según Schiffner (156) inyectando una pequeña cantidad del líquido por vía intraperitoneal, y practicando hemocultivos luego de 10 a 60 minutos, según el índice de

infectividad del agua en examen. Austoni expresa que empleando varios cobayos, la posibilidad de obtener cultivos puros es grande. Esta técnica se basa en que las leptospiras pasan de la cavidad intraperitoneal al torrente sanguíneo más rápidamente que muchas otras bacterias.

Otros métodos que emplean animales son los de Appelman y van Thiel (157, 158): el método del baño, coloca durante 1 hora cobayos pequeños con el abdomen afeitado y escarificado, en el agua en examen calentada a 30° C, de modo que llegue a los costados del animal; al cabo de 3 horas se hacen hemocultivos, en medio de Zuelzer para leptospiras saprófitas, o en medio de Korthof para patógenas. La sensibilidad sería de 1 leptospira/3 ml, pero exige el empleo de 10 cobayos.

El método percutáneo contínuo es una modificación del anterior; en él los cobayos se fijan sobre una tabla en posición decúbito dorsal, y sobre la pared abdominal preparada como antes, se adhiere con colodión o parafina un pequeño cilindro de vidrio, abierto en ambos extremos, y con un tubo de descarga en la parte lateral inferior. Por este cilindro se hacen circular 200-300ml del agua en examen a 30° C, gota a gota, desde un recipiente superior. El método permitiría el aislamiento de 1 leptospira/25-50 ml. Otra modificación es el método subcutáneo contínuo, en el cual el agua circula por una cavidad subcutánea abierta entre dos orificios de la piel del abdomen. La sensibilidad sería de 1 leptospira/50 ml, y podría emplearse con sólo 2 ó 3 cobayos.

Se han propuesto además otras modificaciones a estas técnicas(45)

Obtenido el cultivo de leptospiras, en particular si se han empleado medios de cultivo como los descritos sembrando en ellos la muestra, deberá intentarse su purificación.

Purificación de cultivos contaminados

Esto constituye un problema no siempre fácil de resolver. Numerosos métodos se han propuesto para este fin, basados en propiedades particulares de las leptospiras; algunos antiguos, ya han caído por completo en desuso, como los propuestos por Mochtar (159) empleando la centrifugación fraccionada; Uhlenhuth y Zuelzer (160) por congelamiento y descongelamiento; Hirsch (161) por la acción oligodinámica de algunos metales, o Sugimoto (162) empleando la inhibición por hidrato de cloral.

Kitaoka (163) observó la formación de un anillo blanquecino constituido por leptospiras puras, cuando se sembraba un cultivo, puro o no, en un tubo especial con brazo en ángulo, en condiciones determinadas, y propuso el empleo de este fenómeno para la purificación.

Sin embargo, los métodos más eficaces y más empleados han sido los basados en la filtración. Esta fue empleada ya por Wolbach y Binger (18) (bujías Berkefeld V); otros tipos de bujía, como Pasteur-Chamberland L3 - L5 y equivalentes, también han sido muy usados desde hace tiempo, y lo mismo puede decirse de los discos Seitz EK, que se usan actualmente. En cambio, los filtros de vidrio o amianto comprimido han hallado aplicación limitada.

Para la purificación, mediante discos Seitz, de cultivos contaminados, Wolff (44) recomienda mojar el disco con solución fisiológica, luego filtrar el sobrenadante del cultivo contaminado centrifugado a 3.500 rpm durante 15 minutos y enjuagarlo con medio de cultivo, sembrando luego el filtrado en varios tubos de medio.

Otra técnica muy usada es la "filtración rápida in vivo" de Schiffner, ya mencionada, practicando hemocultivos a los 10 minutos. No siempre se obtienen resultados satisfactorios, en particular si se hallan presentes ciertos tipos de contaminantes, como los vibriones. (164)

Tiérskij (165) intenta mejorar la técnica mediante el empleo de ratones blancos en vez de cobayos.

Stavitsky (166) propone el empleo de sulfanilamida en el medio

de cultivo (Vervoort). Evidentemente, sólo pueden eliminarse con este método los microorganismos sensibles a la sulfanilamida. Análogamente, Cousineau y McKiel (167) proponen un medio con sulfatiazol, sulfato de neomicina y actidiona. Červa (citado por (172)) habría conseguido algunos éxitos mediante el empleo de distintos tipos de sulfas.

Menges, Rosenquist y Galton (168) aplican para aislamiento de leptospiras de orina contaminada el método de dilución y siembra sugiriendo su empleo en forma más general.

Galton, Menges y Shotts (169) recomiendan, aparte de la filtración por discos Seitz, realizar diluciones desde 10^{-3} hasta 10^{-7} del cultivo contaminado, y sembrar 0,1 ml de cada una en cajas de Petri con medio de Cox y Larson. Además, hemos visto que se han propuesto otros medios sólidos. (96, 97)

Cada uno de los métodos anteriores tiene sus ventajas e inconvenientes. Ninguno puede considerarse satisfactorio por completo, especialmente si la contaminación es muy abundante.

Acerca de los métodos de filtración, debemos recordar que las leptospiras necesitan ser sembradas masivamente en un medio de cultivo para su desarrollo (motivo por el cual los repiques se hacen mediante pipeta Pasteur, y no con asa de platino); esto explica el porcentaje muy elevado de fallas que se observan en el uso de los filtros Seitz, bujías y elementos similares, en los que la adsorción juega un papel muy importante, permitiendo sólo el paso de cantidades ínfimas de leptospiras. Por otra parte, se habría comprobado que tales filtraciones tienen un efecto desfavorable sobre el desarrollo de estos microorganismos. (170)

Por estos motivos, diversos investigadores ensayaron otros elementos modernos, las membranas filtrantes, de características muy superiores por su baja adsorción, gran uniformidad en el tamaño de los poros y mínima intercomunicación entre los mismos. Es conocida la variedad de usos que este tipo de filtros halla en el campo de la bacteriología y virología. Puede hallarse una presentación general sobre sus características y aplicaciones en un trabajo de

R. Ehrlich (171) sobre el tema, y en los folletos suministrados por las casas especializadas, como Millipore Filter Corp. • Bedford (EE.UU.), Sartorius-Werke AG- Göttingen (Alemania). Oxo Ltd. (Inglaterra) y otras.

Pokorný y Havlik (172) ensayan algunos filtros alemanes (Sartorius) hallando que el N° 3 (poro máximo $0,5 \mu$; medio $0,3 \mu$, retiene completamente hongos, elementos levaduriformes y bacilos esporulantes, pero no cocos. Las leptospiras pasan perfectamente, siendo en cambio retenidas por el filtro N° 8 (máximo $0,25 \mu$; medio $0,15 \mu$). No poseyendo filtros intermedios, modifican por ebullición en agua (3 veces, 20 min. por vez) el poro del filtro N° 3 hasta un valor óptimo, no determinado, consiguiendo retener también los cocos, y obtener en el filtrado únicamente las leptospiras. También logran el mismo resultado empleando juntos dos filtros N° 3 hervidos una sola vez 20 minutos, pero pasan menos leptospiras por efectos de una mayor adsorción.

Daubner (173) trabaja con filtros soviéticos así como con otros análogos, producidos por él mismo. Halla que tanto por el filtro N° 1 (poro $0,3-0,35 \mu$) como por el N° 2 (poro aprox. $0,5 \mu$) pasan las leptospiras, pero el primero produce mayor retención.

Con el N° 2 puede separarse leptospira de *E. coli*, *A. aerogenes*, *Staph. albus* y *Sarcina lutea* (suspensiones añadidas al cultivo de leptospiras) y también pueden separarse las leptospiras de una muestra de agua de río adicionada de un cultivo de las mismas. En este caso hallan conveniente una filtración previa, con filtros soviéticos de poro $0,5 - 3 \mu$, para eliminar las impurezas de mayor tamaño.

Respecto del aislamiento de cepas de leptospira del agua expresan que sería necesario mejorar el método, empleando otros filtros de menor tamaño de poros.

Kmety (174) halla que para purificar cultivos contaminados, los mejores resultados se obtienen con filtros Sartorius N° 8 (poro máximo $0,25 \mu$ y medio $0,15 \mu$).

Rittenberg, Linscott y Ball (175) informan que con membranas norteamericanas (Millipore) tipo HA (poro $0,45 \pm 0,02 \mu$) se logra se-

parar leptospiras de mezclas efectuadas experimentalmente añadiendo E.coli, Staph. aureus y H.influenzae, y que con membranas PH ($0,30 \pm 0,02 \mu$) se logra un menor número de cultivos positivos de leptospira.

Papel epidemiológico de las aguas

Las leptospirosis son zoonosis, pues sus agentes etiológicos son huéspedes naturales habituales de ciertos animales que los transmiten al hombre. Este no es esencial en el ciclo vital de estos microorganismos.

Los animales portadores pueden dividirse de modo general en:

1) Portadores propiamente dichos. No parecen ser muy afectados por las leptospiras, pero las alojan largo tiempo. Son en especial los mamíferos silvestres.

2) Portadores facultativos. Albergan las leptospiras durante cierto tiempo después de superar la enfermedad. Son particularmente los animales domésticos.

El hombre es reservorio de estas espiroquetas en general sólo durante la enfermedad, por lo que en ese sentido no tiene importancia epidemiológica.

Las leptospiras se multiplican en los riñones, siendo eliminadas por la orina, que de este modo infecta las aguas, líquidos cloacales y lodo, donde sobreviven más o menos tiempo de acuerdo a las condiciones ambientales. Estas pueden así infectar al hombre, ya sea bebiéndola o por contacto con las mucosas o la piel abrasionada o aún sana. El contacto puede establecerse a causa de caídas accidentales en el agua, por natación o razones ocupacionales. Los niños, pescadores de agua dulce, cortadores de caña, arroceros, obreros de frigoríficos y de ocupaciones ganaderas son los más expuestos. Es mucho más frecuente la infección a través del agua o fango que por contacto directo con animales.

Entre los animales de mayor significación epidemiológica se hallan, en primer lugar, los roedores (ratas, topos), los suinos, perros, bovinos, equinos y ovinos. Recientes estudios han probado

la importancia de los pájaros migratorios e insectívoros en la diseminación de distintos serotipos de leptospira.

El agua juega siempre un papel fundamental en la difusión de las leptospirosis en una región.

La explicación más aceptada sobre la existencia de leptospiras patógenas en las aguas, es que éstas llegan, como se ha dicho, mediante la orina de los animales portadores, y que en el ambiente externo sobreviven más o menos tiempo.

La hipótesis de la transformación ("Umwandlung") de leptospiras saprófitas en virulentas, halla hoy menos partidarios, lo mismo que la suposición de que en el agua existen y se mantienen, tanto leptospiras saprófitas como patógenas, sin intervención de animales portadores.

Sin embargo, el problema no está aclarado.

Van Riel (176) no admite que las leptospiras patógenas sólo se multipliquen en los animales, y sostiene que los animales "reservorios" tienen una importancia secundaria, siendo en cambio el agua lo fundamental.

Kathe manifiesta que las *Leptospira grippotyphosa* pueden vivir independientemente, fuera del organismo animal; por otra parte, Babudieri estima que las leptospiras sobreviven, y en ciertas condiciones pueden multiplicarse en el agua; influirían la temperatura, pH, presencia de sustancias orgánicas, microflora y microfauna asociadas y otras condiciones desconocidas. Si no hubiese tal multiplicación, no se podría comprender cómo aparece la infección en ciertos arrozales italianos en los que no se hallan animales portadores, o en algunos pantanos y zonas inundadas de Silesia. Además, la dilución de las orinas emitidas es tan grande que resulta difícil imaginar cómo las leptospiras penetran en el organismo en número suficiente como para provocar una infección, si no se multiplican en el agua.

El tema ha sido discutido también por Fühner (1950), van Thiel (1948) y Van der Hoeden, que sostiene un punto de vista opuesto. (citado por (100)).

Numerosos observadores comprobaron que el pH de las aguas tiene

gran influencia en la presencia de leptospiras y en el número de casos de leptospirosis que se observan en las regiones vecinas. En aguas ácidas no se hallan por lo común leptospiras, siéndoles en cambio favorable un aumento del pH hasta un valor próximo a 8. Los trabajos realizados en laboratorio sobre el tema han estado casi siempre limitados a un suerotipo y uno o pocos valores de pH. Solo recientemente Gordon-Smith y Turner (102) realizan un estudio sobre 4 suerotipos en agua destilada con buffer M/250 de fosfatos en un rango de pH desde 5,30 a 8,00, y observan que el modo en que varía la sobrevivencia con el pH es distinto para cada suerotipo, aunque en líneas generales ésta es mayor a pH comprendido entre 7,60 y 8,00. A pH menor de 7,0 la sobrevivencia está entre 10 y 117 días, y a pH mayores, entre 21 y 152 días. En este trabajo se comparan los resultados obtenidos con los de anteriores observadores, de modo que en él y en la obra de Mailloux y Kolochine Erber (100) se pueden hallar referencias a dichos trabajos previos.

La temperatura y el pH no serían independientes en el efecto sobre la sobrevivencia; Okazaki y Ringen (177) hallan que *L-pomona* sobrevive en medio alcalino (pH = 8,4) más tiempo que en medio ácido (pH = 6,2) a 20 - 30° C, pero a 7 - 10° C la sobrevivencia es mayor en medio ácido.

Gordon Smith y Turner (102) estudian someramente también la influencia de la composición de algunos suelos : la adsorción de leptospiras podría intervenir en la baja incidencia de leptospirosis humana en algunos arrozales con suelos arcillosos de cierto tipo.

Las leptospiras parecen tener una tolerancia más bien grande respecto de la temperatura; si bien la sobrevivencia no es favorecida por temperaturas extremas, han sido aisladas del hielo por Zuelzer (cit. por (100)), y de fuentes termales (40 - 50° C) por Hindle (cit. por (2)) y por Zuelzer (178). Las temperaturas más favorables serían las de las aguas tropicales, 25 - 30° C.

Polanen (179) sostiene que el comportamiento de las patógenas es igual al de las saprófitas frente a la temperatura, pero Van Thiel expresa que estas últimas pueden cultivarse a unos 15° C, y en cam-

bio las patógenas tienen una mayor sensibilidad a las bajas temperaturas.

El agua salada ejerce una influencia desfavorable en la vida de las leptospiras, lo que explica que no se hayan descrito jamás contagios por medio del agua marina. En Amsterdam, durante la 2^a guerra mundial, el número de casos de leptospirosis producidos por caídas accidentales en los canales desapareció bruscamente luego de 1944, cuando los polders fueron inundados por agua salada. (100). La influencia de la sal ha sido estudiada por Ruys (180), hallando que el agua de lago, pobre en cloruro, permite una sobrevivencia de 10 días, mientras que en la del mar del Norte no pasa de las 24 horas.

Análogamente Chang, Buckingham y Taylor (137) hallan que la *Leptospira icterohaemorrhagiae* sobrevive pocas horas en agua con 18-22 g de sal por litro. También Addamiano (181), experimentando con cepas de *Leptospira icterohaemorrhagiae* en diluciones de agua marina esterilizada en agua destilada halla que la sal mata rápidamente las leptospiras y que el efecto disminuye con la dilución de ésta.

Pese a lo expresado, Zuelzer (182) ha aislado cepas de leptospira del agua del Mar del Norte, y Babudieri y Archetti (138) del Adriático y del Tirreno.

Dada su condición de aerobias, las leptospiras no pueden vivir en aguas muy pobres o carentes de oxígeno.

También son desfavorables las sales de metales pesados; durante un tiempo se intentó en los arrozales impedir la acción de las leptospiras patógenas elevando la concentración de SO_4Cu desde 1/200.000, ya empleada para algas, a 1/40.000. El método debió abandonarse por razones económicas, dado que para algas bastaba añadirlo una sola vez, pero como el agua circula, en el caso de las leptospiras debía ser repuesto diariamente. (183)

Otras sustancias tienen similar acción, y así en Japón se propuso la adición previa de cianamida cálcica en los arrozales secos, sirviendo además como fertilizante. (183)

La formación de SH_2 por degradación de proteínas, si no es excesiva, favorece tanto el desarrollo o sobrevivencia de leptospiras,

como el de otros microorganismos que a su vez favorecen a las leptospiras. (Corsetti (184))

En opinión de Van Thiel, (185), las leptospiras patógenas tienen tendencia a dirigirse hacia las partes más profundas. Esto podría ser causado por una probable producción de SH_2 en el fondo (lino) por descomposición de materia orgánica (186); durante el movimiento de las aguas, por ejemplo por la natación, las leptospiras son llevadas al resto de la masa líquida y aumenta la probabilidad de infección.

Los microorganismos asociados pueden tener una influencia positiva sobre las leptospiras, como ocurre con las Thiobacterias y Beggiatoas y algunos hongos, o impedir su desarrollo, como lo hacen las Vorticellas. (178). Durante las tareas de laboratorio, se observa que frecuentemente cuando se contamina un cultivo, las leptospiras no son favorecidas e incluso se pierden. Otras veces, más raramente, se halla una influencia favorable o nula. Muchos autores piensan que las patógenas son más sensibles que las saprófitas a la influencia de los contaminantes, pero Zuelzer sostiene que no hay diferencias.

Abdoelrachman (187) estudia este problema in vitro, empleando varias cepas de leptospira y microorganismos del suelo, del agua, y del intestino (normal y patógenas), hallando sensibles diferencias de acción de distintos contaminantes frente a las varias cepas de leptospira, aún cuando éstas pertenezcan al mismo tipo (p. ej. biflexas).

Respecto de las aguas intensamente contaminadas y líquidos cloacales, Noguchi (188) y Chang, Buckingham y Taylor (137) encuentran sobrevividas muy cortas, de pocos días o pocas horas. No obstante, se han aislado cepas patógenas de esos medios (Alston) (189) y también biflexas (Leiguarda) (144).

Addamiano (181) halla que en medios estériles de pH alcalino, a 30°C las patógenas sobreviven 3-5 meses, pero si están contaminadas mueren rápidamente; en cambio a menores temperaturas sobreviven más. No hay fenómenos de competencia entre saprófitas y patógenas en el agua.

Aislamientos y estudios de cepas de leptospira de aguas de la
República Argentina

En 1952, R. Leiguarda (144) realiza un estudio sobre un elevado número de muestras de diversos tipos de aguas y líquidos cloacales, a fin de determinar la influencia de los procesos de purificación del agua potable sobre las leptospiras, e intentar el aislamiento de cepas puras.

Empleando el agar de Zuelzer, resultan positivas el 100% de las muestras de líquido cloacal, el 33-44% de las aguas superficiales, según su origen, el 14% de las de pozo y el 0% de las de consumo. La cloración elimina completamente las leptospiras.

No se observa influencia alguna del pH, entre 6,8 y 9,1, ni tampoco coincidencia con la presencia de bacterias coliformes.

El autor halla que el aislamiento de cepas puras mediante filtración por bujías Chamberland L 3, Berkefeld N o discos Seitz EK_s es sumamente difícil de lograr, a causa del pasaje de contaminantes al filtrado y a la elevada retención de leptospiras, ya sea filtrando los cultivos contaminados del agar de Zuelzer o aplicando la filtración a las muestras antes de sembrarlas, en ese medio o en el de Savino y Rennella, que resulta más favorable. Tampoco obtiene buenos resultados mediante el pasaje rápido por cobayo.

Luego de numerosos intentos, logra aislar 6 cepas puras y 5 poco contaminadas, que enviadas al Instituto Malbrán para su enfrentamiento con colecciones de sueros inmunes de leptospiras patógenas, revelan no tener ninguna relación con éstas.

Posteriormente Babudieri intentó el aislamiento de leptospiras de varias muestras de agua en la Argentina y el Brasil, mediante el agar de Zuelzer y la filtración por discos Seitz. Los resultados son publicados en Brasil a fines de 1952 (43), informándose del aislamiento y estudio antigénico de una cepa proveniente de Sao Paulo (cepa Sao Paulo) y otra de una fuente de la Plaza de Mayo de Buenos Aires (cepa Buenos Aires). La primera, está relacionada suerológicamente

camente con la cepa Patoc 1 (luego se supo que ambas lo están con el suerotipo semaranga), y en cambio la Buenos Aires es prácticamente independiente

En 1962, Cacchione y colaboradores (190) estudian aguas de distintos puntos de la ciudad de Buenos Aires y sus alrededores, así como de zonas rurales del país, empleando el medio de Zuelzer en su versión original y modificada por Kolochine Erber, aplicando también las técnicas de Schiffner y de Appelman y van Thiel. Los autores obtienen con el medio de Zuelzer mejores resultados que con el empleo de animales.

Para la purificación de cultivos contaminados de este medio, recurren a las bujías Chamberland L3, los filtros Seitz y la técnica de Schiffner. Mediante los discos Seitz, consiguen la purificación de una cepa proveniente de la fuente del Monumento de los Españoles, de Buenos Aires, y la denominan Buenos Aires 2.

En cambio, otra cepa que no pudo ser purificada con estos métodos, es liberada de sus contaminantes por pasaje en medio de Korhof adicionado de penicilina G sódica (1.000 U/ml), repicando al cabo de 48 horas. La cepa se denomina Ranchos, por provenir de ese arroyo.

El estudio antigénico de las cepas obtenidas frente a las cepas y sueros de la colección de los autores revela que la cepa Buenos Aires 2 es igual a la Buenos Aires, y la Ranchos es independiente.

Las leptospiras acuícolas y su composición antigénica

Hemos visto que algunos autores sostenían que las leptospiras acuícolas podían en ciertas circunstancias adquirir patogenicidad, y que hoy la opinión que prevalece es que éstas son inocuas y no pueden transformarse en patógenas.

A medida que este punto de vista fué afirmándose, el interés por estos microorganismos fué recayendo sobre su estructura antigénica. Shiga, Uhlenhuth y Grossman, Schiffner y Mochtar, y Shiozawa hallaron que las cepas por ellos estudiadas eran independientes y no exhibían relaciones suerológicas apreciables entre sí. Uhlenhuth, en 1937 (193), notó que aún de un mismo conducto de agua es posible aislar diversos tipos suerológicos, y expresó que las variedades serían casi infinitas y muy difícilmente podrían hallarse en la naturaleza cepas suerológicamente equivalentes.

Incluso se ha sostenido que los caracteres antigénicos de las leptospiras acuícolas son variables, y no pueden clasificarse suerológicamente. Se realizaron algunos intentos de clasificación de leptospiras acuícolas en base a sus características culturales: Damon y Hampil (99) distinguían dos grupos, uno de los cuales desarrollaba a 37° C, y el otro constaba sólo de leptospiras que crecían a temperatura ambiente.

Si bien las leptospiras saprófitas son antigénicamente distintas no sólo de las patógenas, sino incluso entre sí, pueden hallarse en la naturaleza cepas afines. Así, en 1930 Zimmermann estudió 15 cepas, y halló 3 afines; Bessemans y Thiry (194) estudiaron cuatro (Gand 2, Gand 3, PsI y SS) y las hallaron iguales o muy parecidas; Thiry, en 1931, encontró además afinidad entre 3 cepas (Lierre, Hatrival y Ottinges). En 1939 Bessemans, Wittebolle y Devuyt (195) estudiaron, entre otras cepas, las acuícolas WaZ, Wa Leiden, Wa7, OII, Tokio y Freiburg, hallándolas diferentes, aunque relacionadas entre sí. Las reacciones más fuertes se producían entre las 3 primeras por una parte y las dos últimas por otra, hecho notable por la gran distancia entre los orígenes de

dichas cepas (Tokio y Freiburg). Por otra parte, Kitaoka estudió las cepas Z₁ y Z₆ y las halló casi idénticas.

Los trabajos que acabamos de mencionar, así como algunos otros de más reciente data, (43, 79, 190, etc.) abarcan únicamente un número limitado de cepas. Hasta el presente, el intento más serio de esbozar una posible clasificación de las leptospiras acuiferas, siquiera de modo preliminar, sigue siendo el trabajo de Babudieri y Archetti (138), realizado sobre 34 cepas, muchas de las cuales fueron aisladas por estos autores. Para ello emplearon el agar de Zuelzer y la filtración por Seitz EK, fraccionando el filtrado adicionado de suero de conejo, en 4 ó 5 tubos. De tal modo, en una oportunidad observaron el desarrollo en 4 tubos de un tipo de leptospira (AM 1 B) y en el quinto de otro tipo completamente distinto (AM 1 D), y señalaron la importancia del hecho, pues la posibilidad de que en un cultivo de un mismo filtrado coexistan diversos tipos de leptospira, uno de los cuales puede ir prevaleciendo a lo largo de una serie de pasajes, debe tenerse en cuenta antes de afirmar la producción de un cambio en los caracteres serológicos.

Babudieri y Archetti hallaron que había cepas vinculadas entre sí y otras independientes; distinguieron entre las primeras 4 grupos, I, II, III y IV, caracterizados por la presencia en cada uno de un antígeno común a los integrantes del grupo: A, C, U y J. Además, las cepas ubicadas dentro de los grupos I y II, estaban frecuentemente vinculadas por otros antígenos, B y D, mientras que los grupos III y IV eran independientes.

Puesto que es posible realizar un agrupamiento de cepas, sugirieron que el número de antígenos, si bien es muy elevado, (y el mosaico antigénico es muy complejo) es finito.

El comportamiento serológico de las cepas exhibía ciertas características particulares; en ocasiones se observaron aglutinaciones con cepas heterólogas a títulos mayores que con la cepa homóloga, hecho ya descripto por otros investigadores. Más extraño era en cambio que con algunos grupos de sueros y cepas se no -

taba que la aglutinación cruzada no tenía lugar en las dos direcciones, y profundizando el estudio de estos casos emitieron la hipótesis de la existencia de un nuevo tipo de antígenos incompletos, tales que provocarían "in vivo" la formación de anticuerpos, pero luego "in vitro" no serían capaces de reaccionar con éstos. (138, 196)

Según los autores, esto podría explicar las aglutinaciones con cepas heterólogas a título mayor que con la homóloga, y las reacciones asimétricas de aglutinación cruzada.

A pesar del extenso trabajo cumplido por Babudieri y Archetti, no existe hasta hoy clasificación de *L. biflexa*; sin embargo, en la última propuesta de clasificación del Género *Leptospira* realizada por el Subcomité de Taxonomía de *Leptospira* del Comité Internacional de Nomenclatura Bacteriológica se han incluido algunas cepas acuícolas, en particular las relacionadas con *L. semaranga*. Precisamente estas leptospiras han hallado una aplicación práctica.

En el suerodiagnóstico, es preciso enfrentar cada suero-problema con una cepa de c/u de los suerotipos que pueden hallarse presentes en el país, en general, unos 10 a 20; en regiones aún no estudiadas se requeriría el empleo de todos los suerotipos conocidos; esto implica un considerable gasto de material y tiempo.

Se observó que la cepa *biflexa* Patoc 1 aglutina con todo suero humano positivo a leptospira, de modo que puede emplearse para establecer la presencia o no de anticuerpos, como primera orientación. El fenómeno podría explicarse suponiendo que en esta cepa el antígeno S, común a todo el género, es superficial. (31, 197, 198)

Para sueros bovinos, la aglutinación sólo ocurre con el 20% de los sueros positivos; en cambio la cepa Sao Paulo reacciona con el 40% de los mismos. Será necesario buscar y ensayar nuevas cepas *biflexas*.

Análogamente se ha estudiado el empleo de leptospiras *biflexas* en ensayos de sensibilización de eritrocitos, en forma de extractos alcohólicos, (199, 200) y en pruebas de fijación de complemento (201) aunque generalmente no son preferidas a las anteriores.

MATERIALES Y METODOS

Medios empleados y su utilización

1) Medio de Savino y Rennella modificado.

Durante la primera parte de este trabajo se empleó el medio de Savino y Rennella modificado (91) por reemplazo del suero ovino con sangre defibrinada hemolizada de conejo, al 10%. En algunas ocasiones se empleó al 5%.

En primer lugar se prepara el medio básico mineral:

PO ₄ HK ₂	2	g
ClNa	3	"
SO ₄ Mg	0,05	"
Cl ₂ Ca	0,01	"
H ₂ O bidestilada	1	litro.

Se lleva a pH 7,10 - 7,15, requiriéndose aproximadamente 3,7 ml de HCl 1N por litro de solución. Esterilizar en autoclave durante 20 minutos a 1 atmósfera, y una vez frío añadir 0,5% de solución estéril de hematina al 1%.

La sangre defibrinada hemolizada se obtiene vertiendo estérilmente sangre de conejo extraída por punción cardíaca en un Erlenmeyer que contiene perlas o anillos de vidrio y un volumen de agua bidestilada igual al de sangre a verter. Agitar para defibrinar y filtrar luego el líquido por discos Seitz esterilizantes. Al añadirlo al medio mineral se toma en cuenta la dilución efectuada.

Luego se fracciona en tubos de ensayo tapados con algodón, recubierto en gasa, controlándose la esterilidad por incubación a 37°C durante 24 horas.

2) Medio de Korthof modificado por Babudieri.

Posteriormente hemos empleado el medio de Korthof modificado por Babudieri (45) como se utiliza en este Instituto de Zoonosis (46).

Se disuelve:

Proteosa peptona N ^o 3, Difco	800	mg
ClNa	1,400	"
CO ₃ HNa	20	"
Cl ₂ Ca	40	"

ClK	40 mg
PO ₄ H ₂ K	180 "
PO ₄ HNa ₂ .2H ₂ O	960 "
Acido nicotínico	1 "
Agua destilada ..	1 litro.

Llevar a ebullición durante 30 minutos, luego completar al volumen inicial y dejar en reposo toda la noche para decantar el precipitado. Luego se filtra por papel doble y se pasa a un Erlenmeyer provisto de tubuladura de salida baja, a la que está unida una campana de vidrio para fraccionamiento por medio de un tubo de goma látex. Se esteriliza en autoclave durante 30 min. a 1½ atm. y se deja enfriar. Se añade 1 mg. de vitamina B₁₂, que se tiene ya fraccionada en solución estéril en ampollas, y por último se agrega 5% de suero de conejo ligeramente hemolizado.

Este suero se prepara por filtración a través de discos Seitz esterilizantes de un "pool" de sueros de conejos normales. El suero de cada animal se ensaya previamente mediante pruebas de micro-aglutinación para comprobar que no aglutina las cepas de leptospira.

Los animales aptos son sangrados estérilmente por punción cardíaca, parcialmente o a blanco, colocándose la sangre en frascos estériles que se dejan luego a temperatura ambiente para que se retraiga bien el coágulo, y luego el suero extraído se centrifuga a 2.000 rpm durante 20 minutos, filtrándose el sobrenadante por discos Seitz como se indicó.

Una vez preparado el medio, se fracciona en tubos de ensayo tapados con algodón recubierto en gasa, a 5 ml por tubo. Se tinda-liza 3 veces, a 56° C durante 30 minutos, con intervalos de 8 horas a 1 día, y se efectúa control de esterilidad a 37° C durante 24 - 48 horas. El pH final del medio debe ser 7,2 - 7,4.

3) Medio con sulfanilamida.

Para purificación de cepas contaminadas mediante la sulfanilamida, se prepara una solución de esta droga en agua destilada, disolviendo en caliente 4 g en 100 ml. Se deja enfriar hasta unos 50 - 55° C y se vierte sobre el filtro Seitz en el que se acaba de filtrar el suero de conejo a emplear en el medio

de Korthof. La concentración final de sulfanilamida en el medio debe ser de 4 g por litro.

Una variante utilizada cuando no se dispone del medio preparado con sulfanilamida, es añadir a cada tubo de medio de Korthof una parte de solución estéril de sulfanilamida de 4 g/100 ml por cada ml de medio de cultivo. La solución de sulfanilamida y el medio preparado con ésta deben ser de reciente elaboración. Hemos observado que en caso contrario se inhibe el desarrollo de las leptospiras.

4) Medios con SO_4Cu de Fízi y Csóka. (145)

En base al medio de Korthof descrito pero sin ácido nicotínico ni vitamina B_{12} , y con 10% de suero de conejo, se preparan los medios empleados por Fízi y Csóka para diferenciación de leptospiras saprófitas de patógenas según la resistencia al SO_4Cu . En vista de los resultados obtenidos por Cacchione y colaboradores (72), de los que resulta que la mejor diferenciación se logra con diluciones de SO_4Cu 1:40.000 y 1:100.000, éstas han sido empleadas en todos los casos. En algunos se ensayaron además las diluciones 1:30.000 y 1:200.000.

Se prepara el medio de Korthof indicado con 10% de suero y se coloca la cantidad necesaria en tantos frascos estériles como diluciones se llevarán a cabo. Por otra parte, se prepara una solución madre de SO_4Cu al 1% en H_2O destilada y se esteriliza en autoclave, añadiendo luego a cada frasco con medio de Korthof la cantidad necesaria para obtener la dilución final requerida. Obtenidas éstas, se fraccionan en tubos de hemólisis a razón de 2 ml por tubo, y se efectúa el control de esterilidad.

Luego se siembra aproximadamente 0,2 ml de cada cepa en cada dilución, por duplicado, incluyendo controles con cepas patógenas y biflexas conocidas, empleando para ello cultivos de 8 días en lo posible, de modo que estén en fase óptima de desarrollo. Se incuban a 28°C y se realizan observaciones del desarrollo en cada tubo mediante examen microscópico al fondo oscuro, a los 3, 5 y 7 días de incubación.

5) Medio de Korthof modificado por Babudieri y Zardi. (135)

Este me-
dio se emplea para diferenciación de leptospiras saprófitas y pató-
genas, y se prepara y fracciona exactamente igual que el medio de
Korthof modificado por Babudieri, pero omitiendo el suero y la pep-
tona.

En él se siembran las cepas a examinar y controles de cepas
patógenas y biflexas conocidas, previo lavado de los microorganismos
para evitar un gran arrastre de suero y peptona del medio ante-
rior. Para ello se centrifugan 2 ml de cada cultivo en fase ópti-
ma de desarrollo a 10.000 rpm durante 20 minutos, resuspendiéndose
se los microorganismos sedimentados en igual volumen del medio sin
suero ni peptona. De esta suspensión se siembran 0,3 ml por tubo,
por duplicado. Se realizan además controles en medio con suero y
peptona, y se incuban todos a 28° C. El examen de vitalidad se efec-
túa al 3º, 5º y 7º día, como en la prueba de Fúzi y Csóka, al mi-
croscopio de fondo oscuro. Cada 7 días se efectúa un nuevo repique
de cada cepa a otros tubos del medio sin suero ni peptona y se con-
tinúa el examen de igual forma, a efectos de determinar durante cuán-
tos pasajes es capaz de mantener el desarrollo cada cepa.

6) Medio químicamente definido de Mailloux y Kolochine-Erber

Se em-
plea con el mismo objeto que el anterior, y se prepara del siguien-
te modo: (148)

	Solución fisiológica al 8,5 ‰	100 ml
(1)	Solución buffer de Sørensen de pH 7,5	100 "
	Solución de asparagina M/10	20 "
(2)	Solución buffer de glicocola de pH 8,2	40 "
	Agua destilada	740 "

Llevar a pH 7,50.

(1) Buffer de Sørensen:

{	$\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,876 g/l)	-- 95 ml
	PO_4HK_2 (9,078 g/l)	----- 5 "

(2) Buffer de glicocola:

(Glicocola 0,1 M -----	97,5 ml
(HONa 1 N -----	0,25 "
(ClNa -----	1 g
(H ₂ O -----c. s. p.	100 ml
(Llevar a pH 8,2

Se esteriliza el medio en autoclave y se añaden 200 µg de vitamina B₁₂. Se fracciona y tindaliza como el medio de Korthof.

Las siembras, repiques y exámenes son en un todo análogos a los empleados con el medio de Korthof modificado por Babudieri y Zardi.

7) Medio sólido de Aktan y Ertuğrul. (97)

Hemos intentado purificar cultivos contaminados empleando este medio, preparado del siguiente modo:

Se preparan 500 ml de una solución con las sales del medio de Korthof, adicionado 1,7% de agar especial Noble (Difco).

Al coagulo proveniente de 60 ml de sangre de conejo se añaden 20 ml de agua destilada estéril. Luego de algunas horas de contacto a temperatura ambiente se filtra la solución de hemoglobina obtenida por disco Seitz esterilizante, se adicionan 50 ml de suero estéril de conejo y se tindaliza 3 veces a 56° C cada vez, con intervalos aproximados de 8 horas. Luego se añade este líquido al medio con agar preparado, fundido y enfriado hasta 50° aproximadamente. Se fracciona en tubos, dejándolos solidificar en posición inclinada ("pico de flauta"). Se realiza control de esterilidad.

8) Medio semisólido de Zuelzer modificado por Kolochine-Erber (100)
(46)

Este medio se emplea para aislar de aguas leptospiros saprófitas.

Agar - - - - -	10 g
(1) Solución buffer de Sørensen, pH 7,5	750 ml
Agua destilada - - - - -	2250 "
Sulfanilamida - - - - -	12 g

(1) Solución buffer pH 7,5:

{ PO ₄ HNa ₂ M/15 -----	630 ml
{ PO ₄ H ₂ K M/15 -----	120 "

Esterilizar a 1 atm. durante 20 minutos. Se fracciona en frascos de Roux estériles, a 100 ml por frasco.

Aparte, se prepara :

Yema estéril de huevo fresco --- 10 ml
 Agua destilada estéril ----- 20 ml

Se añade 1 ml a cada botella de Roux, se acuesta y se deja solidificar.

En este medio se siembran aproximadamente 25 ml de agua a examinar y se deja a temperatura ambiente en la oscuridad. Se examina el líquido sobrenadante entre los 15 y 30 días aproximadamente por microscopía de fondo oscuro. En caso de no haber desarrollo de leptospiras, se continúa observando hasta 50 ó 60 días. Hemos hallado en varias oportunidades desarrollos muy tardíos.

9) Medio con tioglicolato para control de esterilidad.

Se usó con

la modificación introducida por Brewer, con dextrosa e indicador de E_H , preparado por B.B. L., disolviendo 3,85 g de polvo en cada 100 ml de agua; se deja reposar 5 a 10 minutos, calentando y agitando hasta disolución completa. Se fracciona en tubos de hemólisis hasta la mitad de su altura y se autoclava a 1 atm. durante 15 minutos. El medio puede utilizarse mientras la oxidación, indicada por el colorante, no sobrepase la mitad de la altura de la columna líquida. Se conserva a temperatura ambiente.

Según el fabricante, la composición es la siguiente :

(BBL 01-135).

Trypticase y Phytone (peptonas)---	20 g/litro
Dextrosa -----	10 "
ClNa -----	5 "
PO ₄ HK ₂ -----	2 "
Tioglicolato de Na -----	1 "
Azul de metileno -----	0,002 g/l.
Agar -----	0,5

pH - 7,2

Hemos empleado este medio para control de esterilidad al purificar cepas, teniendo presente que algunos autores como Pokorny y Havlik (172) sostienen que en medios para leptospira, en ocasiones los microorganismos contaminantes no desarrollan de modo tan visible.

Animales empleados

a) Cobayos. Fueron utilizados en los primeros ensayos de aislamiento mediante filtración "in vivo", y en intentos aislados de obtener un suero capaz de impedir el desarrollo de otros microorganismos.

Se emplearon animales de 150 a 200 g de peso aproximadamente. La inoculación se hizo siempre por vía intraperitoneal, con los materiales y cantidades que se especifican en cada caso. Luego se obtuvo sangre por punción cardíaca en condiciones de esterilidad, y se empleó ya sea sembrando unas gotas en medios de cultivo o dejando coagular y recogiendo el suero, según el fin perseguido.

b) Conejos. Se utilizaron animales sanos, de peso no inferior a 2 kilogramos, tanto para preparación de medios de cultivo con suero como para obtención de sueros hiperinmunes, aplicando las técnicas que se describen por separado.

Preparación de sueros hiperinmunes

Se obtuvieron en conejos que reunían las condiciones señaladas. Antes de su empleo, se verificó la ausencia de anticuerpos para leptospira, mediante las técnicas de microaglutinación.

Se inocularon por vía intravenosa (vena marginal), cultivos vivos de la cepa de leptospira en fase óptima de desarrollo en medio de Korthof. Los cultivos en general tenían 8 días de incubación a 28° C, y se inyectaron 2 ml. cada vez, en tres inoculaciones a intervalos de 8 días. Seis días después de la última, se extrajo una muestra de sangre y se determinó en el suero el título homólogo. Cuando éste era bajo (menor de 1:10.000), se realizó una cuarta inoculación, y una semana después el animal fué sangrado a blanco estérilmente por punción cardíaca, y el suero recogido y centrifugado se esterilizó por filtración y fraccionó en ampollas de 1 ml., que se cerraron a la llama con soplete evitando calentar el contenido. Se guardaron en congeladora a -20° C hasta usarlas.

La técnica descrita es la utilizada en este Instituto (14).

Elementos filtrantes

1) Bujías. Se emplearon dos bujías Pasteur-Chamberland L 3 provistas de oliva en su parte superior para admisión del líquido a filtrar, que era recogido en tubos-Kitasato de 450 x 55 mm adaptados a las bujías.

2) Discos Seitz EKs. Se utilizaron discos de 6 cm de diámetro con soportes Seitz de tipo cerrado.

En los ensayos de filtrabilidad de leptospira se emplearon discos de fabricación alemana marca Kreuznacht.

3) Membranas filtrantes. ("membranas moleculares")

Las primeras experiencias fueron realizadas con un soporte "ISOPOR" (A.G.Chemical Co., Pasadena, EE.UU.) para membranas de 47 mm de diámetro, marca Millipore (Millipore Filter Corp., Bedford, Mass., EE.UU.). Las membranas eran tipo HA (diámetro de poro, según el fabricante, $0,45 \mu \pm 0,02 \mu$), blancas, sin retículo.

El soporte era cuidadosamente lavado y enjuagado con agua bi-destilada, secado en estufa y luego armado, colocando en su lugar la membrana, y ajustado. Se esterilizaba, envuelto en papel, en autoclave, evitando exceder los 121° C durante 20 minutos, así como descompresiones bruscas que suelen desgarrar la membrana. El Kitasato destinado a recoger el líquido se esterilizaba por separado.

Luego se dejaba secar en estufa a temperatura inferior a 120°C; la membrana no es estable en presencia de oxígeno a temperaturas superiores a 125°C, según el fabricante.

Posteriormente se trabajó con soportes Millipore para membranas de 13 mm de diámetro (adaptadores "Swinnny"), para jeringa hipodérmica a bayoneta, tipo Luer-Lok.

Como se aprecia en la fotografía N° 1, el sistema consiste en la jeringa, una cabeza roscada macho, una empaquetadura-anillo ("O-ring") de Teflon, la membrana con su faz filtrante dirigida hacia la jeringa, una malla de níquel perforado que soporta la membrana, una arandela-empaquetadura plana de Teflon, una base con rosca hembra dentro de la cual entra todo el sistema descrito y es ajustado por acción de la rosca, y una aguja para jeringa con pico Luer-Lok.

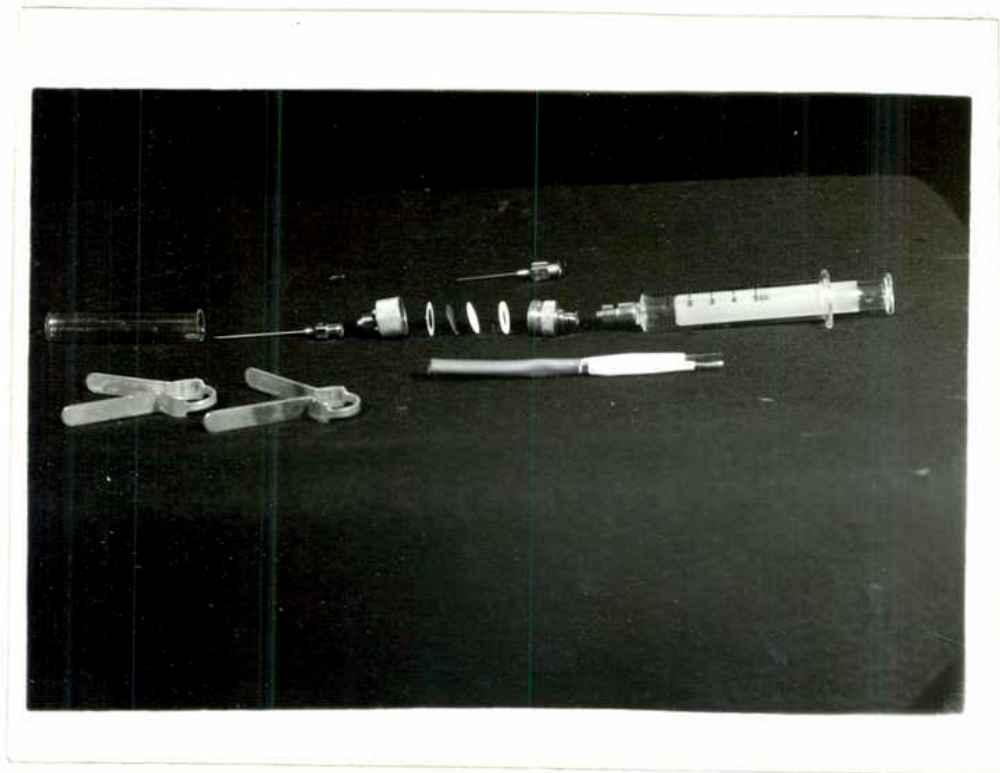


Foto Nº 1

Este sistema, excepto la membrana, era cuidadosamente lavado y secado en estufa dentro de una caja de Petri. Antes de armarlo se verificaba la ausencia de partículas o rasguños que producen pérdidas durante la filtración, examinándolo con una lente de aumento. La membrana se colocaba en su puesto mediante las pinzas de picos planos y pulidos, que se ven en la foto, para evitar que la dañen, y el swinny se ajustaba con unas pinzas especiales como se vé en la foto Nº 2



Foto Nº 2

Con la aguja colocada y protegida por un tubo de hemólisis, el swinny se colocaba dentro de un tubo de mayor tamaño, se tapaba con

un capuchón de papel y se esterilizaba en autoclave con las precauciones ya mencionadas.

Por su parte, la jeringa, con otra aguja que servía para aspirar el líquido a filtrar, se esterilizaba en un portajeringa. En la foto N° 3 se aprecian los elementos descritos y las cajas con los distintos tipos de membranas empleados.

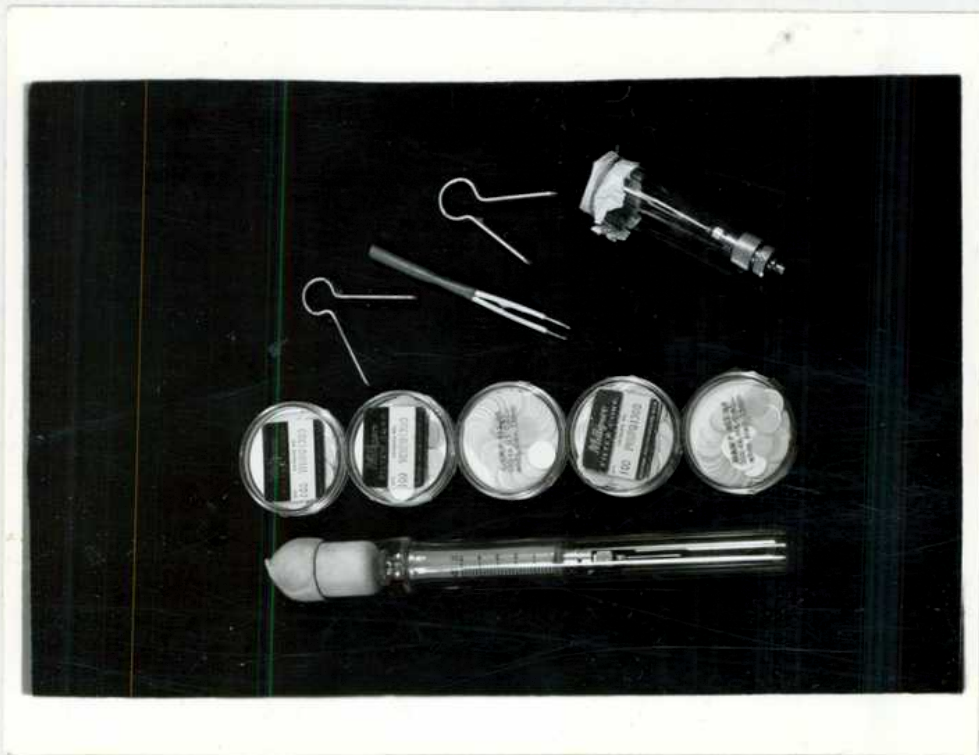


Foto N° 3

Luego de la esterilización en autoclave, se reajustaba con las pinzas especiales el swinny, porque el Teflon tiende a deformarse ligeramente durante el proceso. De lo contrario pueden producirse pérdidas durante la filtración.

Lo dicho hasta acá es válido para las membranas tipo HA (poro = $0,45 \mu \pm 0,02 \mu$), PH (poro = $0,30 \mu \pm 0,02 \mu$) y GS (poro = $0,22 \mu \pm 0,02 \mu$), no así para los tipos VC (poro = $100 \mu \pm 8 \mu$) y VM (poro = $50 \mu \pm 3 \mu$), pues estas últimas no pueden ser autoclavadas y deben esterilizarse sin calentarlas, por métodos tales como la esterilización gaseosa, la luz ultravioleta o radiaciones de otro tipo.

Empleamos el óxido de etileno (reactivo BDH) envolviendo en sobrecitos hechos con papel manteca las membranas a utilizar una por una, y colocándolas después envueltas juntas en un recipiente de vidrio con tapa esmerilada lubricada con vaselina-parafina para lograr un cierre hermético.

Dado que el oxido líquido es un poderoso disolvente, hemos evitado el contacto con las membranas colocándolo en un tubo tapado con algodón dentro del recipiente. Se calculó un exceso de reactivo, de modo de lograr una esterilización segura. Después de 24 h de contacto con el gas, se retiraron y dejaron ventilar las membranas envueltas para eliminar el gas esterilizante.

En este caso los soportes swinny eran autoclavados por separado y luego se colocaba en su lugar la membrana estéril en el soporte ya seco, mediante pinzas estériles, ajustándose luego el soporte con las pinzas especiales.

Una vez preparado el sistema y cargada la jeringa con el material a filtrar (muestra de agua o cultivo), se quitaba la aguja y se colocaba en reemplazo el swinny con su aguja, inoculándose los tubos de medio de Korthof con el filtrado como se ve en la foto N° 4



Foto N° 4

Luego, con el propio swinny y su aguja se colocaba una gota sobre un portaobjetos para el examen del líquido filtrado.

Muestras de agua

Fueron recogidas en frascos estériles, y filtradas y sembradas lo más rápidamente posible. En general fueron mantenidas mientras tanto a baja temperatura (aprox. 10° C), y frecuentemente procesadas el día de su recolección o al día siguiente.

Observaciones microscópicas

En la primera parte de este trabajo se utilizó un microscopio Carl Zeiss-Jena, con condensador de fondo oscuro, ocular 15x y objetivo 50x, trabajando con preparados realizados entre portaobjetos y cubreobjetos.

Posteriormente dispusimos de un microscopio binocular Reichert equipado con "focostat" y condensador de fondo oscuro, objetivos 10x, 20x, 40x y ocular 12,5x, con el cual fué posible omitir el cubreobjetos y realizar en un mismo portaobjetos un número de observaciones, dividiéndolo mediante trazos con lápiz dermatográfico en cuadros individuales en los que se depositaba con el asa la gota a examinar. De ordinario se empleó el aumento menor, especialmente para efectuar una serie grande de observaciones, como al leer reacciones suerológicas de microaglutinación o examinar el desarrollo de cultivos. Empleamos como líquido de contacto entre portaobjetos y condensador, agua glicerizada, como ya se utiliza en otros laboratorios sin experimentar desventajas notables por la diferencia de índice de refracción, y facilitando la limpieza.

Estudio suerológico de cepas aisladas

El procedimiento seguido en el estudio suerológico de las cepas aisladas ha sido el siguiente:

1º) Prueba de microaglutinación (Martin y Pettit).

Se enfrentó la cepa problema con los inmunosueros de los 18 suerogrupos de leptospiras patógenas (Clasificación OMS/FAO, 1959) y de cada una de las cepas bivalentes que se poseen en la colección de este Instituto, así como también frente a los sueros hiperinmunes preparados con las cepas que hemos aislado.

Se emplearon dos diluciones, 1:100 y 1:1.000, para evitar un posible error frente a un fenómeno de zona negativa.

Cuando la reacción era positiva, se repetía enfrentando a diluciones mayores el suero reaccionante con la cepa en estudio, y con la cepa homóloga, a fin de determinar el título y la dilución límite en que la aglutinación tenía lugar con la cepa examinada.

Además, en los casos en que se obtuvo resultado positivo a un suerogrupo, se investigó la cepa frente a los suerotipos de leptospira que componen ese suerogrupo, determinando también el título máximo.

Con esos datos, se calculó el porcentaje del título homólogo como indican Wolff y Broom.

Para aquellas cepas con las que se preparó el suero hiperinmune, se efectuó la prueba contraria, es decir, enfrentando dicho suero con la cepa elegida de cada suerogrupo, con la colección de cepas biflexas y con aquellas que habíamos aislado y sometíamos a estudios antigénicos. El procedimiento era análogo al anterior.

Las reacciones se llevaban a cabo preparando en una batería de tubos de hemólisis esterilizados diluciones de los sueros con solución fisiológica, partiendo de 1:10. De cada dilución se colocaba luego 0,05 ml en cada tubo de una serie con tantos tubos como antígenos se iban a emplear; además se preparaba para cada antígeno un testigo, con 0,05 ml de solución fisiológica en vez de dilución de suero.

Luego se agregaba a cada tubo 0,45 ml del antígeno correspondiente, obteniéndose así las diluciones finales que parten de 1:100; se agitaba ligeramente, e incubaba a 37^o C alrededor de 2 horas, leyéndose luego los resultados al microscopio de fondo oscuro.

Cuando no se conocía el orden del título, se realizaban como primera orientación diluciones 1:100, 1:1.000, 1:10.000, ... y posteriormente se efectuaban diluciones intermedias.

Se tuvo presente que no es conveniente hacer diluciones menores de 1:100, pues los títulos de los sueros son siempre mucho más elevados y a bajas diluciones tienen lugar con frecuencia aglutinaciones no específicas.

Los antígenos eran suspensiones vivas de leptospiras, con buen desarrollo, en medio de Korthof, de no más de 15 días.

Se verificaba la ausencia de "aglutinaciones" en ellos, antes de emplearlos, y, en caso de haberlas, eran eliminadas previamente mediante centrifugación a baja velocidad, empleando el sobrenadante.

Cuando los cultivos eran muy ricos, se diluían con solución fisiológica.

Se consideraba dilución límite al efectuar las lecturas, aquella en la cual el 50% de los microorganismos quedan libres, sin aglutinar. Este límite es generalmente aceptado por razones de orden práctico.

En la foto N^o 5 se aprecia:

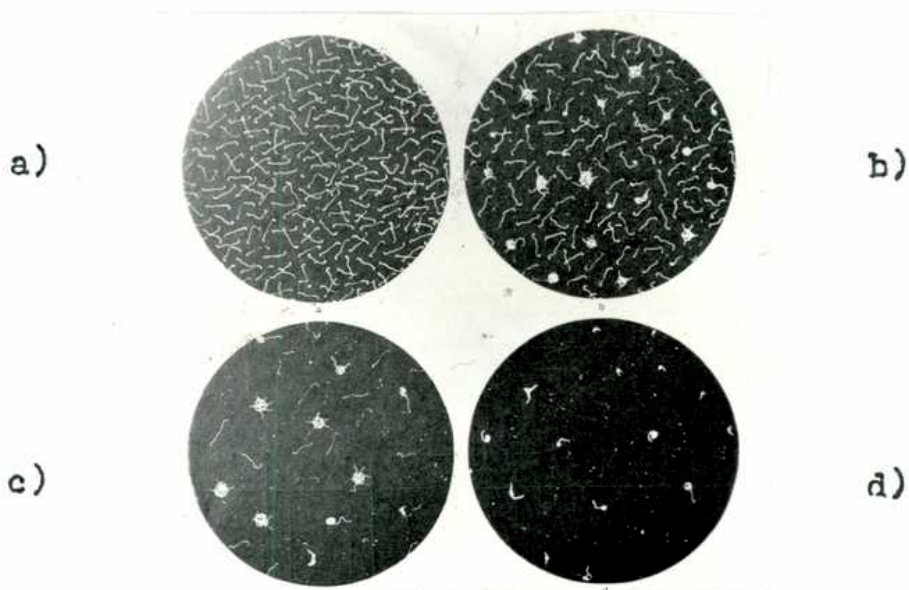


Foto N^o 5

a) el aspecto que ofrece tanto un testigo como una reacción negativa; b) una reacción positiva, con el 50% de aglutinación; c) aglutinación intensa o total. Quedan escasas leptospiras libres; d) reacción muy fuertemente positiva; prácticamente no hay leptospiras libres, y los núcleos de aglutinación son muy compactos. Estos tipos de aglutinaciones sólo se ven con leptospiras vivas. Como veremos en seguida, con antígeno formolado el aspecto es diferente.

2^o) Pruebas de adsorción de anticuerpos.

Aproximadamente 300 ml de cultivo de la cepa a emplear para adsorción, que había alcanzado su desarrollo óptimo en medio de Korthof, se formolaban adicionando 5 ‰ de formol al 40%. Se centrifugaba a 10.000 rpm durante 30 minutos, examinando el sobrenadante antes de descartarlo para asegurarse que se había logrado una buena sedimentación.

El sedimento era resuspendido en 1 ml de suero a adsorber di-

luido a título standard 1:1.000 y se dejaba en contacto 24 horas a temperatura ambiente.

Luego se centrifugaba aproximadamente durante 20 minutos a 2,000 rpm, y con el sobrenadante se efectuaban reacciones de micro-aglutinación, partiendo de diluciones 1:10, empleando antígenos formolados al 5 ‰. Se verificaba que la adsorción había sido correcta, comprobando que el suero ya no aglutinase la cepa empleada para adsorberlo.

Las reacciones se llevaban a cabo dejando en contacto el suero adsorbido con las cepas ensayadas durante no menos de 4 horas, a temperatura ambiente. Las lecturas se realizaban al microscopio de fondo oscuro.

Al efectuar estas pruebas, el testigo debe permanecer sin aglutinaciones, y tener un aspecto similar al del empleado en las pruebas con antígeno vivo, excepto la inmovilidad de los microorganismos muertos, como es lógico.

Las aglutinaciones (reacción positiva) ofrecen en cambio un aspecto muy distinto, siendo mucho menos compactas y en forma de masas irregulares, como se observa en la foto N^o 6

Podemos añadir que con ciertos tipos de leptospira se producen aglutinaciones con antígeno vivo en forma de haces y no de glóbulos más o menos esféricos.



Foto N^o 6

P A R T E E X P E R I M E N T A LEnsayos preliminares

Los primeros ensayos de aislamiento de leptospira fueron realizados mediante la aplicación de la técnica de filtración rápida "in vivo" por cobayo, según Schüffner (156), sembrando 3 a 5 gotas de la sangre obtenida por punción cardíaca, en el medio de Savino y Rennella modificado ya descripto. En este mismo medio se sembró también directamente la muestra de agua en cantidad de 0,5 ml por tubo con 10 ml de medio de cultivo. Dado que las observaciones realizadas de las muestras revelaban que el número de leptospiras presentes en ellas debía ser muy escaso, pues no se observaban habitualmente al microscopio, se intentó aumentar la probabilidad de éxito aplicando una técnica de concentración de leptospiras por centrifugación diferencial, análoga a la utilizada por Wolff para diagnóstico de leptospiras en sangre mediante examen microscópico al fondo oscuro (44). Van Thiel y Schüffner también recomiendan centrifugar la orina en la que se desea demostrar microscópicamente la presencia de leptospiras.

En experiencias orientativas realizadas por nosotros sobre muestras de agua adicionadas con una pequeña cantidad de cultivos de leptospiras, hemos observado que la centrifugación a 1.000 rpm aproximadamente durante 5 minutos no afecta apreciablemente la concentración de leptospira, pero se logra una concentración considerable a 4.000 rpm durante unos 30 minutos.

En algunos casos se han obtenido cultivos intensamente contaminados en los que se sospechó la presencia de leptospiras, los que fueron filtrados por cobayo, con resultados siempre negativos, mediante la técnica de Schüffner mencionada. El resultado de las 12 primeras experiencias nos indicó que en el medio de cultivo empleado no conviene sembrar la muestra de agua porque el desarrollo de otros microorganismos es tan rápido y abundante que impide el de las leptospira. Tampoco ha dado resultado el pasaje por cobayo.

Con una muestra posterior (número 13) se intentó aislar única-

MUESTRA	ESTADO DE LA MUESTRA		PRINTE	CONCENTRACION		ELIMINACION		FILTRACION PREVIA POR LANA		SEÑALA DIRECTA EN MEDI DE CUBIERTA N° DE RECUADROS TUBOS HASTA LOS 10 DIAS
	ABSCOPICO	MICROSCOPICO		TRATAMIENTO	VECES	DE PRECIPIT.	COSEJO	VOLUMEN	SANGRIA	
1	LAGO DE LA PLATA	2 escaso 1 regular	decent.	20 min. 4000 RPM	2 min. 1000 RPM	1	1 ml.	45 min.	2	2
	LAGO DEL PARQUE " DE FEBRERO"	3 ausente 1 regular		20 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	2	5 ml.	60 min.	4	3
	RIO AGUA VIEJA	3 ausente		30 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	3	5 ml.	60 min.	4	3
	CHILECITO (LA RIVERA)	3 ausente		30 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	4	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO YAGUAYÓN	3 ausente		30 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	4	5 ml.	60 min.	4	3
	ZALTA	3 ausente		30 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	4	5 ml.	60 min.	4	3
	TRC	3 regular		30 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	4	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO DEL PARQUE " DE FEBRERO"	3 regular 1 grande	decent.	35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	5	5 ml.	60 min.	4	3
	TRC	3 regular		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	6	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO DEL PARQUE " DE FEBRERO"	3 regular 1 grande		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	6	5 ml.	60 min.	4	3
	TRC	3 abundante		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	7	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO DEL PARQUE " DE FEBRERO"	3 muy grande	Filtrac. por papel	35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	7	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO MISTERS	3 muy escaso		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	8	5 ml.	60 min.	4	3
	COLOMIA GARMINEZ	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	9	5 ml.	60 min.	4	3
	TO CHUBUT	3 regular		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	9	5 ml.	60 min.	4	3
	RIO ABAJUAN	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	10	5 ml.	60 min.	4	3
	TIRIGATTA	3 regular		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	10	5 ml.	60 min.	4	3
	CATAPAY	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	11	5 ml.	60 min.	4	3
	OTRO	3 abundante		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	11	5 ml.	60 min.	4	3
	LAGO DEL PARQUE " DE FEBRERO"	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	12	5 ml.	60 min.	4	3
	RIO CHUSCHA	3 grande		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	12	5 ml.	60 min.	4	3
	ZAFAYATE (SALTA)	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	13	5 ml.	60 min.	4	3
	ARROTO NIEMCO	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	13	5 ml.	60 min.	4	3
	MARILUCHE	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	13	5 ml.	60 min.	4	3
	(RIO FEBRO)	3 ausente		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	13	5 ml.	60 min.	4	3
	IDEM N° 2	3 escasa		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	13	5 ml.	60 min.	4	3
	IDEM N° 1)	3 IDEM		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	14	5 ml.	60 min.	4	3
	2% de culti- vo cepa 24 1	3 IDEM		35 min. 4000 RPM	5 min. 1000 RPM	14	5 ml.	60 min.	4	3

3 = sedimento 1 = turbidez L = no se observan leptospires af. = microflora D = detritus P = protozoos A = algas E = estéril
decent. = decantación durante 1 hora Filtrac. por papel. (poro fino) CL = contaminado sin leptosp. L/C = N° de leptospires por campo.

mente por pasaje por cobayo, y simultáneamente realizamos una experiencia de orientación (número 13 A) adicionando a una porción de la misma un cultivo de *Leptospira biflexa* (Wa Z) en proporción del 2 ‰, resultando que ni aún inoculando una gran cantidad al cobayo fué posible recuperar la cepa en hemocultivos practicados a los 15 y 60 minutos.

Ello indicaría que el método es poco sensible y que la técnica de filtración por cobayo requiere la inoculación de material muy rico en leptospiras, como se hace para purificar cultivos contaminados, y no resultaría muy adecuada para aislar cepas patógenas y biflexas del agua.

El resultado resumido de todos estos ensayos se expone en el Cuadro Nº 1. Como no se deseaba emplear medios de cultivo como los de Zuelzer, Hindle, etc., que sólo permiten desarrollo de leptospiras no patógenas, se intentó en una serie de experiencias lograr un medio más favorable para leptospiras para su eventual aislamiento posterior, empleando sustancias activadoras del desarrollo y factores de crecimiento de leptospiras según Savino y Rennella (91). Se usaron el medio básico mineral de los autores mencionados, el autolizado de levaduras teniendo en cuenta su contenido en nitrógeno, la hematina y la vitamina B-12. Se empleó para esta experiencia una muestra de agua en la que se observaron por examen microscópico al fondo oscuro algunas leptospiras, aunque en número muy escaso. Esta muestra procedía del mismo sitio que la Nº 2, mencionada en el cuadro Nº 1.

En la primera serie de pruebas no se añadió medio mineral, de modo que las sales presentes eran exclusivamente las que la propia muestra contenía. Las experiencias se hicieron por duplicado y se detallan en el Cuadro Nº 2.

En la segunda serie se sembraron 0,5 ml de la muestra en 10 ml de medio básico mineral estéril con los activadores y factores de crecimiento. Se realizó también por duplicado y se detalla en el Cuadro Nº 3.

Todos los tubos fueron incubados a 28° C - 30° C.

Cuadro Nº 2

Tubo Nº	Muestra	Vit. B-12	A.L.	Hematina
1	10 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
2	"	0,05 ml	0	0,05 ml
3	"	0	0,05 ml	0,05 ml
4	"	0,05 ml	0,05 ml	0
5	"	0	0	0,05 ml
6	"	0	0,05 ml	0
7	"	0,05 ml	0	0
8 (controles)	"	0	0	0

Cuadro Nº 3

Tubo Nº	Vit. B-12	A.L.	Hematina
1	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml
2	0,05 ml	0	0,05 ml
3	0	0,05 ml	0,05 ml
4	0,05 ml	0,05 ml	0
5	0	0	0,05 ml
6	0	0,05 ml	0
7	0,05 ml	0	0
8 (controles)	0	0	0

Nota: A.L. - solución de autolizado de levaduras, de 0,5 g N/100 ;

Vit. B-12 - solución de 1 µg/ml de Vitamina B-12.

Hematina - solución de 1 mg/ml.

Observaciones semanales, realizadas hasta las 8 semanas, no evidencian ningún efecto favorable sobre las leptospiras originariamente presentes en la muestra. Persiste la contaminación aproximadamente al mismo nivel anterior, y además no se pudo detectar en ningún caso la presencia de leptospira al fondo oscuro.

Por ello, siempre sobre la misma base, hemos intentado emplear medios más favorables con los siguientes elementos:

- a) Biosate (Extracto de Levadura e Hidrolizado pancreático de caseína) BBL.

b) Acidicase (hidrolizado ácido de caseína) BBL.

c) Extracto de levaduras BBL.

siempre sobre la base del medio mineral básico de Savino y Rennella y la hematina como factor de crecimiento.

Medio 1) Biosate ----- 2%
 Hematina ----- 0,005%
 Medio Mineral de Savino y Rennella.

Medio 2) Extracto de Levadura 1%
 Acidicase ----- 1%
 Hematina ----- 0,005%
 Medio Mineral de Savino y Rennella

Se fracciona y esteriliza a $\frac{1}{2}$ h., $\frac{1}{2}$ atm., (a 10 ml por tubo).

En estos medios, más apropiados seguramente que los anteriores para el desarrollo de leptospiras, sembramos por triplicado 5 gotas de un cultivo bien desarrollado de *Leptospira biflexa* (WaZ), de medio con 5% de sangre de conejo. Se logró que la cepa desarrolle algo en ellos, manteniéndose durante 4 repiques efectuados cada 25 días en el primer medio; luego no se continuó la experiencia. En el segundo, creció apreciablemente menos, y se perdió en el 3^{er} repique. En este caso ello podría indicar que, al menos para esta cepa, el hidrolizado enzimático resulta más favorable que el ácido, probablemente por su diferencia en contenido de triptofano y vitaminas a causa de la hidrólisis ácida, que los afecta, o al tipo de péptidos que resultan de tales tratamientos de la caseína. Se observa en estos cultivos la presencia de muchas formas largas, hasta 10 veces la longitud usual, como Zuelzer las observara en medios de cultivo con suero de asno, según Austoni (2)

Hemos considerado muertas las leptospiras inmóviles, y hemos contado las activamente móviles por separado al dar el número de Leptospiras por campo en el cuadro N^o 4

Muestras de agua sembradas en estos medios produjeron desarrollo muy rápido y abundante de microorganismos contaminantes y no de leptospiras, por lo que no son aptos para nuestros fines.

Cuadro Nº 4

Medio Nº	Primer repique		Segundo repique		Tercer repique		Cuarto repique	
	Observaciones		Observaciones		Observaciones		Observaciones	
	A los 13 días	A los 25 días	A los 13 días	A los 25 días	A los 13 días	A los 25 días	A los 13 días	A los 25 días
	4-5 L/C	se man- tiene igual	15 L/C	5 L/C				
1	Muchas L.l.	"	Escasas L.l.	-	Igual que repique anterior.		Igual que repique anterior.	
	Pocas L. muertas	"	5 L/C muertas	10-20 L/C muertas				
2	2 L/C. Muchas L.l.	2 L/C Todas son L.l.		Igual que repique anterior	No hay desa- rrollo.		-	
	80% L. muertas	80% L. muertas						

Nota: L/C - número de leptospiras por campo.

L.l. - formas anormalmente largas.

- - - - -

A partir de este momento, ensayamos técnicas de filtración de muestras por diversos sistemas filtrantes, antes de sembrar en medios no selectivos, que permiten el desarrollo de leptospira. Quisimos así separar en lo posible la contaminación de las leptospiras previamente.

Se trabajó con muestras del lago del Parque 3 de Febrero, en el que se habían observado algunas leptospira por examen al fondo oscuro. Se tomaron muestras de 250 ml, se las filtró por papel de filtro estéril de poro cerrado para eliminar en parte la materia suspendida y se disolvió Biosate en cantidad necesaria para tener solución al 2%. Luego se filtró por bujía Pasteur-Chamberland L 3 en un tubo Kitasato aplicando vacío.

Los filtrados aparecían estériles al fondo oscuro.

- Una parte, (A) se fraccionaba estérilmente en 10 tubos, a 10 ml en c/u.

- Otra parte, (B) era inoculada en 10 tubos, conteniendo cada uno 10 ml. de medio mineral de Savino y Rennella, 2% de Biosate y 0,005% de hematina. El inóculo era de 1 ml por tubo. En esta serie B se suministraba a las posibles leptospiras viables contenidas en el inóculo un medio en el que la hematina y las sales estarían en mejores condiciones que en (A).

Al resto del filtrado se añadía 10% de sangre defibrinada hemolizada de conejo y se dividía en dos partes:

- Una parte (C) se fraccionaba en 10 tubos, a 10 ml por tubo;
- Otra parte (D) se sembraba en 10 tubos del medio descrito en (B), a 1 ml por tubo.

Para controlar la aptitud de los medios empleados, en dos tubos de cada serie (A, B, C y D) se sembró una gota de un cultivo bien desarrollado de *Leptospira biflexa* (Wa Z); se observó a los 7, 22 y 30 días de incubación a 28 - 30° C. En los controles se pudo apreciar desarrollo de leptospira, pero en todos los demás no hubo desarrollo alguno de estos microorganismos, permaneciendo estériles o, a veces, contaminados.

En una oportunidad se observó el desarrollo en dos tubos de la serie B, de un microorganismo semejante a *Spirochaeta plicatilis*, que no desarrolló posteriormente en repiques efectuados en medios basados en los minerales de Savino y Rennella, con y sin sangre defibrinada de conejo y/o peptona como la descrita (Biosate).

Sobre una muestra proveniente de Arroyo del Rey (Llavallol), en la que también se habían observado una o dos leptospiras, se procedió como en la serie C únicamente, empleando otra bujía L₃. Todos los tubos permanecieron estériles aún al mes de incubación.

No habiendo logrado que las leptospiras observadas en las muestras desarrollen en el filtrado, hemos querido tener idea acerca de qué retención de leptospiras efectuaban las bujías L₃, para lo cual realizamos la experiencia siguiente :

En 100 ml de medio mineral de Savino y Rennella (sin esterili-

zar) se disolvieron 2 g de Biosate y se añadió 1 ml de un cultivo bien desarrollado de *Leptospira biflexa* (Wa Z). Se homogeneizó, y se observaron en el microscopio unas 10 leptospiras por campo, con buena movilidad.

Filtramos por papel de filtro de poro cerrado, sin observar variación apreciable en el contenido de leptospira. Luego filtramos por bujía L3. En el filtrado no se observaron leptospiras. Se añadió 10% de sangre defibrinada hemolizada de conejo y se sembró 1 ml en c/u de 10 tubos de medio mineral con 2% de Biosate. El resto del filtrado se fraccionó estérilmente en 10 tubos.

Se incubó y observó el estado de los tubos al microscopio de fondo oscuro a los 8 días y al mes:

Cuadro Nº 5

Tubos inoculados con 1 ml del filtrado:			Tubos del filtrado con 10% de sangre defibrinada hemolizada, fraccionado		
Tubo Nº	8 días	30 días	Tubo Nº	8 días	30 días
1	E	C	1	E	E
2	"	E	2	"	"
3	"	"	3	"	"
4	"	"	4	C	C
5	"	"	5	E	E
6	C	C	6	"	"
7	E	E	7	C	C
8	"	"	8	E	E
9	"	"	9	C	C
10	"	"	10	E	E

C - contaminación
E - estéril

Como se observa, en ningún tubo hemos tenido desarrollo de leptospiras.

Dado que disponíamos de dos bujías Pasteur-Chamberland L 3, hemos querido repetir el ensayo de filtrabilidad con ambas bujías, por si los resultados de la anterior experiencia se debiesen a características de la unidad empleada anteriormente. Esta vez se obtuvieron por dilución de 1 ml de cultivo de *L. biflexa* (Wa Z) cada 100 ml de medio mineral estéril, suspensiones con 1 L/campo, que se filtraron y recogieron sobre sangre defibrinada hemolizada de co

nejo (5%), y fraccionaron en tubos estériles en cantidad de 10 ml por tubo, obteniéndose 22 para la bujía N° 1 y 21 para la N° 2. El filtrado no reveló leptospiras al microscopio, y a dos tubos de cada filtrado se inoculó 1 gota de cultivo de *Leptospira biflexa* (WaZ) como control de la aptitud del medio. Examinado a los 21 días, los controles tenían un desarrollo abundante, pero en los 39 tubos restantes no hubo ningún desarrollo y permanecieron estériles, aún al mes de incubación.

Por tanto la retención es muy grande o total, no debiendo esperarse hallar fácilmente *Leptospiras* en el filtrado, al menos en condiciones similares a las nuestras, en las que hemos imitado una muestra de agua ya excepcionalmente rica en *Leptospira*.

Hemos querido luego ensayar los discos Seitz EK₅, esterilizantes. Sobre ellos no hemos filtrado muestras de agua, sino directamente realizado 4 experiencias de filtrabilidad, como la anteriormente descrita para las bujías. Empleamos para esto discos alemanes originales, marca Kreuznacht. Los resultados han sido los mismos que para las bujías, de lo que deducimos que la retención con estos filtros es también muy grande y no se adaptan para nuestros fines.

Ensayamos ahora como elementos filtrantes las membranas moleculares.

1) Ensayo de filtrabilidad. Empleamos el soporte Isopor para membranas de 47 mm de diámetro y las membranas Millipore tipo HA descritas.

De un cultivo rico de *Leptospira biflexa* (WaZ) se tomaron 5,5 ml (contiene unas 100 leptospiras por campo); se centrifugó a 4.000 rpm durante 30 minutos y se tomaron 5 ml del sobrenadante (contiene unas 5 leptospiras por campo), que se filtraron por el sistema descrito armado sobre un Kitasato estéril.

El examen del filtrado reveló la presencia de 1 leptospira cada 3 campos examinados, por lo que el sistema evidentemente deja pasar un número muy apreciable de *Leptospiras*, activamente móviles.

Inoculamos 10 gotas de filtrado en c/u de 8 tubos del medio de cultivo, obteniendo excelente desarrollo a los 15 días; ya a los 7 días hay 5 L/C.

2) Separación de Leptospira pura de una muestra de agua adicionada de Leptospira. Tomamos una muestra del lago del Parque 3 de Febrero que nos ha servido para la mayor parte de los ensayos anteriores.

Separamos el ppdo. grueso por centrifugación a 2.000 rpm durante 20 min., a 10° C, y a 100 ml del sobrenadante le añadimos un concentrado de leptospira preparado como se indica a continuación, obteniendo una muestra con 6 leptospiras por campo. Un cultivo de la cepa Wa Z bien desarrollado (60 leptospiras/campo) se centrifugó a 4.000 rpm durante 45 minutos, y el sedimento se añadió al agua del lago.

Se filtró por Millipore HA, observándose que los primeros 30 ml filtran muy rápidamente, bajando luego la velocidad. Se cortó el vacío; el examen del filtrado reveló 1 leptospira cada 10 campos; se inoculó este filtrado, en el que no se observaban otros microorganismos al microscopio, en 5 tubos de medio de cultivo, sembrando 2 - 3 gotas en c/u.

Se observó el desarrollo en estos tubos, hallando a los 20 días uno contaminado sin leptospira, y cuatro con cultivos en desarrollo, puros, el que recién al mes es abundante. Por ello hicimos inóculos mayores en lo sucesivo

Aplicación de la filtración al aislamiento de cepas nuevas

Se tomó, el día 12-IV-1962, una muestra del lago del Parque 3 de Febrero, en el que se vieron, varias veces, algunas Leptospira directamente. Contiene bacterias diversas, algas, protozoos y detritus. Se eliminó el ppdo. en parte, centrifugando 5 min. a 10° C a 2.000 rpm. El sobrenadante se filtró por Millipore HA, hasta notar disminución de la velocidad de pasaje. Se recogieron 60 ml de un líquido límpido que parecía estéril al fondo oscuro. Se sembraron 10 tubos de medio mineral de Savino y Rennella con 10% de sangre defibrinada hemolizada de conejo y 2 ‰ de Biosate (cada tubo tie

ne 10 ml de medio de cultivo y se siembra 1 ml de filtrado en c/u), y se incubaron 20 días a 28-30° C, plazo al cabo del cual fueron examinados con el siguiente resultado:

Cuadro Nº 6

Tubo

- 1 20 leptospiras por campo y espiroquetas cortas
- 2 Espiroquetas cortas únicamente
- 3 Estéril
- 4 20 leptospiras por campo, cultivo puro (cepa A 2)
- 5 10 leptospiras por campo y espiroquetas cortas.
- 6 10 leptospiras por campo y espiroquetas cortas
- 7 Espiroquetas cortas únicamente.
- 8 150 leptospiras por campo, cultivo puro (cepa A 1)
- 9 estéril
- 10 espiroquetas cortas únicamente.

Estas fueron nuestras primeras cepas aisladas; sólo conservamos las que resultaron puras; es de notar que en repiques posteriores, la cepa A 1 pasó a desarrollar mucho menos que la A 2, (al contrario de lo que ocurrió en el momento de aislarlas), haciéndolo mejor con cantidades de suero de conejo mayores, aún en presencia de Vit. B-12 en medio de Korthof. Por ello, supusimos que pudieran ser distintas, cosa que fué comprobada luego al realizarse su estudio antigénico; en este sentido parecen ser independientes por completo entre sí y frente a todas las otras cepas ensayadas. Diremos también que A 1 exhibía una gran tendencia a autoaglutinarse, que fué desapareciendo luego de numerosos pasajes en medio de Korthof, pudiéndose así al fin emplear como antígeno vivo para su estudio suerológico, realizado en el Instituto de Zoonosis de INTA en 1963

- - - - -

18-IV-1962

Muestra del Río Matanzas. Altura de "La Salada".

No se ven leptospiras al fondo oscuro, en un examen directo.

- 1) Eliminación ppdo. grueso a 1.200 rpm, 10 min. a 10° C.
- 2) Concentración: 10.000 rpm, 15 min. a 10° C. Reducción de 500 ml a 30 ml.

3) Filtración Millipore HA: Estéril al fondo oscuro.

4) Siembra: 1 ml en c/u de 10 tubos del medio de Savino y Rennella modificado.

5) Observación: se efectuó la primera a los 15 días, hallándose todo contaminado, con bacterias de tamaño muy grande inclusive; probablemente se trata de una falla del filtro, o pequeña desgarradura durante el armado.

- - - - -

9-V-1962

Muestra del Río de la Plata, Espigón del Club de Pescadores, 250 m de la costa.

1) Eliminación del precipitado grueso: centrifugación a 2.000 rpm, 10° C, 5 minutos.

2) Filtración por Millipore HA: se recogen unos 50 ml. El filtrado parece estéril al microscopio de fondo oscuro. Se siembra 1 ml en c/u de 10 tubos de medio de Savino y Rennella modificado como se mencionó.

3) Observación: a los 9 días en algunos tubos ya hay desarrollo escaso. Se observan todos a los 20 días de sembrado: 4 tubos contienen cultivos puros de Leptospira: los denominamos B 1, B 2, B 3, y B 4. Otros tres, contienen Leptospira con otras espiroquetas. El resto, espiroquetas puras y/o contaminadas con otros gérmenes. La cepa "B 4" no creció en repiques posteriores y se perdió.

- - - - -

15-V-1962

Muestra del mismo origen que la del 18-IV-1962. (Río Matanzas, altura de La Salada.)

Esta vez observamos 2-3 microorganismos que parecen Leptospira, en cada campo, examinando la muestra sin tratamiento alguno.

1) Eliminación ppdo. grueso: centrifugación 2.000 rpm, 10° C, 5 minutos.

2) Filtración por Millipore HA. Se recogen unos 30 ml. El filtrado parece estéril al fondo oscuro. Se siembra 1 ml en c/u de 10 tubos de medio de cultivo descripto.

3) Observación: Se efectúa la primera a los 10 días. Todos los tubos están contaminados; en 4 de ellos se observan algunas leptospiras. Se elige el menos contaminado y con mayor número de Leptospira, y se lo mantiene por repiques periódicos efectuados mensualmente.

Sospochándose un defecto en el ajuste del soporte mecánico de filtración, se intenta purificarlo refiltrándolo en repetidas oportunidades, modificando el soporte con la adición de arandelas de Teflón de diversos modos, y apoyando la membrana filtrante en

su cara inferior, sobre un círculo de papel de filtro, comprendido dentro de la arandela inferior.

El cultivo, en estas pruebas, fué diluído con solución fisiológica (1:3) y el filtrado de esta dilución fué sembrado en medio de Korthof a 1 ml por tubo (5 tubos), sembrando también otros tubos de ese mismo medio con diluciones (respecto del filtrado) de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . En todos los casos se obtuvieron cultivos otra vez contaminados igual que el material del que se partió. Luego se intentó purificarlo filtrándolo por Millipore PH con Swinny, inoculando 1 ml en c/u de 4 tubos de medio de Korthof. Esto produjo una disminución notable de la contaminación, pero atravesaban la membrana todavía algunas bacterias de pequeño tamaño, posiblemente cocos o cocobacilos. Posteriormente se filtró por Millipore GS, también con Swinny. En una primera experiencia, los tubos sembrados con el filtrado permanecieron estériles, pero en un nuevo intento se logró la purificación perfecta de la cepa. Es de notar que desarrollaba con dificultad, por contraste con lo que ocurría cuando estaba contaminada, y que ese lento y pobre desarrollo se acompañaba además por una fuerte tendencia a autoaglutinarse, espontáneamente. Ninguna de estas desventajas se mitigó empleando más suero de conejo (10%), pero luego de una larga serie de repiques frecuentes, se logró un comportamiento satisfactorio de la cepa: perdió su capacidad de autoaglutinación, y el tiempo necesario para lograr un buen desarrollo, bajó de 15-20 días a 5 ó 6 días. Hemos denominado a esta cepa "Salada"

- - - - -

22-V-1962. Procesada el mismo día.
Muestra del Arroyo Cildóñez - (Altura Avda. Olivera)
Agua muy turbia, con abundante sedimento; temperatura elevada, alrededor de 30° C. No se observan Leptospiras pero sí mucha microflora y protozoos.

- 1) Eliminación sedimento grosero: 5 min. a 2,000 rpm, 10° C.
- 2) Filtración por Millipore HA: filtrado límpido, estéril al microscopio (30 ml).
- 3) Siembra del filtrado en 10 tubos, a 1 ml por tubo de medio de cultivo.
- 4) Observación: a los 10 días todos los tubos se hallan contaminados. En uno de ellos la contaminación es muy abundante pero se

observan leptospiras. Se piensa en un defecto del soporte o en una rotura de la membrana muy pequeña. Repicando de este tubo, sólo creció la contaminación perdiéndose la cepa.

- - - - -

30-V-1962 Procesada 4-VI-1962
Muestra del Río de la Reconquista.
Límpida, anarillenta; sedimento floculento. Protozoos y bacterias. No Leptospira.

- 1) Filtración, directamente, por Millipore HA (30-40 ml). Filtra muy bien.
- 2) Siembra (1 ml en c/u de 10 tubos de medio de cultivo)
- 3) Examen a los 9 días: se observan muy pocas Leptospira puras. A los 27 días se vuelve a examinar.

Cuadro Nº 7

Tubo	Tubo
1) 10 L/C : C ₁	6) 50 L/C : C ₆
2) 40 " : C ₂	7) 25 " : C ₇
3) 50 " : C ₃	8) 30 " : C ₈
4) 30 " : C ₄	9) 60 " : C ₉
5) 30 L/C : C ₅	10) 60 " : C ₁₀

Nota: L/C - leptospiras por campo.

En todos los tubos ha habido desarrollo de Leptospira pura, excepto tal vez el séptimo que parece contaminado con bacterias inmóviles de tamaño muy pequeño; se siembra en caldo común y en agar pico de flauta. Incubado a 37° C, no hay desarrollo de contaminantes en 3 días.

- - - - -

29-XI-1962 Procesada 30-XI-1962.
Muestra del Arroyo Dulce. Km 69, Ruta Rojas-Pergamino.
Turbia y con sedimento. Protozoos y bacterias. No leptospiras.

- 1) Eliminación sedimento grosero: 2.300 rpm, 5 minutos.
- 2) Se siembran 20 ml en agar de Zuelzer - - - - - (A)
- 3) Se siembran 0,5 ml en 5 ml de Korthof, modificado por Babudieri. - - - - - (B)
- 4) Se filtran 30 ml por Millipore HA.
- 5) Observamos que en el filtrado parece haber algunas pocas bacterias o partículas inmóviles, o dotadas de movimiento browniano.

De este filtrado:

- 1) Se siembran 5 ml en Zuelzer tal cual, - - - - - (C)
- 2) Se siembran 5 ml en Zuelzer con 0,2 a 0,3 mg Vit. B₁₂ (D)
- 3) Se siembran 0,5 ml en c/u de 10 tubos de medio de Korthof - - - - - (E)
- 4) Se hacen, en Korthof, diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} - - - - - (F)

Observaciones: (A), (C) y (D) al cabo de 1 mes tienen contaminantes pero no leptospiras. En (A) la contaminación es mucho mayor que en los otros dos.

(B): aparece muy contaminado y sin Leptospira. Observaciones hasta 1 mes.

(E) y (F): Todos los tubos se hallan contaminados. Sólo hay leptospiras, aunque acompañado de otros gérmenes y espiroquetas, en la dilución 10^{-2} y en un tubo de la serie (E). Se mantienen por repiques periódicos. Los denominamos respectivamente "Dulce 1" y "Dulce 2".

Filtrados por Millipore PH, pasan las espiroquetas y las leptospiras, predominando las primeras en cultivos de 7-8 días. Lo mismo ocurre con GS.

Estriado sobre medio sólido de Aktan y Ertuğrul, no se consigue separarlas, pues al tomar colonias y sembrar otra vez en medio líquido (Korthof) siempre aparecen las espiroquetas, contaminantes, con o sin leptospiras. Los intentos con este medio sólido se repitieron por dilución y siembra, con una gota por tubo, empleando el cultivo sin diluir y a diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , por triplicado, para tratar de obtener colonias más separadas. En ningún caso se obtuvo éxito.

Por no haber desarrollo en agar de Zuelzer, se pensó que podría tratarse de una leptospira patógena.

Se intenta eliminar las espiroquetas empleando un suero "anti-espiroquetas", preparado en cobayo.

El cultivo de espiroquetas sin leptospira se logra haciendo dos pasajes del cultivo mezcla en un medio-base de Korthof sin suero ni B-12 ni nicotínico, pero con la adición de 2% de Biosate, que se

esteriliza fraccionado en tubos de ensayo, a 5 ml c/u, tapados con algodón-gasa

Se inocularon estas espiroquetas, intraperitonealmente, a dos cobayos, inyectando 1 ml de cultivo cada 7 días. (4 inoculaciones)

Cuadro Nº 8

Temperatura, °C

Cobayo	Cultivo	Temperatura, °C				
		Inicial	2º día	3º día	5º día	6º día
3808	Dulce 1	38º,2	38º,4	38º,6	39º,8	39º,2
3857	Dulce 2	39º,1	38º,2	37º,9	38º,2	38º,7

Se practico hemocultivo del cobayo 3808 al 5º día, con resultado negativo. Siete días después de la última inoculación se sangraron estérilmente los animales, y añadimos a tubos de medio de Korthof 0,2 , 0,4 y 0,6 ml de estos sueros. En ese medio se repicó 0,5 ml de cultivo bien desarrollado de la cepa correspondiente (Dulce 1 y Dulce 2). En ningún caso se logró inhibir el desarrollo de las espiroquetas, lo que en cambio fué logrado selectivamente por sulfanilamida, como se describe más adelante.

Fueron así obtenidas puras las cepas "Dulce 1" y "Dulce 2".

- - - -

19-I-1962

Procesada 21-I-1962

Muestra del Arroyo Tapalquén, (Altura Loma Negra)

Turbia, no leptospiras. Microflora regular; Protozoarios.

- 1) Eliminación sedimento: Centrifugación 2.500 rpm, 10 min.
- 2) En medio de Zuelzer : 25 ml. Negativo al mes; positivo a los 3 meses.
- 3) En medio de Korthof: 0,5 ml. Intensa contaminación, sin leptospira (examen a los 7 y 20 días).
- 4) En medio de Korthof con sulfanilamida (4 g/l) - Igual resultado que antes.
- 5) Filtración por Swinny (HA): 0,5 ml en c/u de 10 tubos de Korthof
- 6) Filtración por Swinny (PH) - Idem.

Observaciones a los 7 días:

- a) Por HA: Los 5 tubos están muy contaminados; se observan espiroquetas. En un tubo hay también Leptospira. Se desechan.
- b) Por PH: Los tubos Nº 1 y 5 están contaminados y se observa presencia de leptospiras y espiroquetas. El tubo Nº 2 contiene leptospiras puras.

Los tubos 3 y 4 contienen leptospira y espiroquetas, que fueron eliminadas por sulfanilamida.

Se tienen así puras las cepas Tapalquén 2, Tapalquén 3 y Tapalquén 4 que crecen con dificultad y se aglutinan espontáneamente en buena medida. Este problema se solucionó por repiques frecuentes.

- - - -

20-I-1963 Procesada 22-I-1963
Muestra de agua de pozo de la zona de Coronel Rosetti (Depto. General López, Santa Fe)
Muy límpida, casi estéril. Hay algunas formas que podrían ser leptospiras.

Se siembran 25 ml en Zuelzer; permanece sin desarrollo de leptospira al menos 30 días.

Se filtra por Swinny con HA, sembrando 0,5 ml en c/u de 10 tubos de medio de Korthof.

A los 8 días (28-I-63) todos los tubos se hallan contaminados, pero en 8 de ellos se observan leptospiras y en ninguno espiroquetas.

Se numeran del 1 al 8.

Se intenta mantener las leptospiras por repiques sucesivos, intentando también purificarlas por filtración en la medida en que se dispone del material. La cepa N° 2, refiltrada por HA, no mejora apreciablemente. Se pierde. Tampoco mejora la N° 3 filtrada por el mismo tipo de membrana.

Se intenta aplicar el medio sólido de Aktan a estas cepas, con la misma técnica que se empleó para Dulce 1 y Dulce 2 y con igual fracaso.

Pudieron en cambio obtenerse en estado de pureza las cepas N° 3 y N° 6 mediante filtración por PH. (Rosetti 3 y Rosetti 6), las que desde entonces desarrollaron perfectamente y con rapidez. Se desecharon los demás cultivos contaminados por tener ya dos puros.

- - - -

15-II-1963 Procesada 22-II-1963
Muestra del Río Pireco, Cascada de Santa Ana (Neuquén)

Agua muy límpida y fría. Casi estéril al fondo oscuro; no se ven leptospiras.

Filtrada por PH con Swinny, sembrando 1 ml en c/u de 10 tubos de medio de Korthof. El filtrado parece contener algunas bacterias inmóviles o partículas de pequeño tamaño, en escasa cantidad.

Se examinan los tubos a los 25 días, hallándose 5 tubos estériles y 5 contaminados sin leptospiras ni espiroquetas.

- - - -

16-II-1963 Procesada 23-II-1963
 Muestra del lago Nahuel Huapi (Villa La Angostura, Neuquén),
 tomada a 100 metros de la costa.

Se procesa de modo análogo a la anterior, pero con membranas
 EA.

Las observaciones de la muestra antes y después de filtrar
 son iguales a las de la muestra anterior.

El examen de los tubos a los 25 días revela 7 tubos estériles
 y 3 contaminados sin leptospiras ni espiroquetas.

- - - -

16-II-1963 Procesado 27-II-1963
 Muestra del lago Nahuel Huapi (Puerto Blest, Neuquén), tomada
 a 200 metros de la costa.

Agua muy límpida y fría. Se ven algunas bacterias móviles e
 inmóviles.

Se filtra por HA con Swinny e inoculara 1 ml en c/u de 10 tubos
 de Korthof. El filtrado parece estéril al fondo oscuro.

Examinados a los 30 días, se observan 5 tubos estériles y 5
 contaminados sin leptospiras ni espiroquetas.

- - - -

En el cuadro Nº 9 se resumen los resultados más importantes
 de las 12 muestras ensayadas hasta el momento. De él se deduce que
 en 3 de las 11 muestras filtradas por HA se han obtenido cultivos
 puros de leptospira en uno o más tubos; en dos casos, sólo atra-
 viesan la membrana HA leptospiras y espiroquetas. En total, han
 desarrollado leptospiras, puras o contaminadas, en 8 de las 11 mues-
 tras filtradas por HA. Además, las leptospiras han atravesado la
 membrana PH en los 3 ensayos de purificación realizados, y aún la
 GS en los dos casos ensayados.

En las 6 últimas muestras se han conseguido resultados más rá-
 pidos mediante el empleo del medio de Korthof, modificado por Babu-
 dieri. Teniendo presente lo expuesto, hemos aplicado una nueva par-
 tida de membranas HA, PH y GS de 13 mm, para Swinny, a un estudio
 sobre 18 nuevas muestras de agua, comparando la eficacia de cada
 una de estos tipos de membrana entre sí y respecto del agar blando
 de Zuelzer, a fin de poner a punto el método de aislamiento hallado.

Con cada muestra se intentó también la siembra directa de
 0,5 ml de la misma en 5 ml del medio de Korthof con sulfanilamida
 descripto, como lo propone Stavitsky (166) para aislamiento de lep-
 tospiras de materiales contaminados. Las observaciones fueron rea-

Cuadro Nº 9

Muestra Nº	Origen	Filtro	Resultado en los distintos tubos	Purificación ulterior	Cepas obtenidas puras	Zuelzer
1	Lago Parque 3 de Febrero	HA	L,LS,S,E.	-	A 1 y A 2	No se hizo
2	Río Matanza (Salada)	HA	C	-	-	"
3	Río de la Plata	HA	L,LS,S,SC	-	B1,B2,B3 y B4.	"
4	Id. Nº 2	HA	LC	PH; final con GS	Salada	"
5	Arroyo Cildañez	HA	LC Se pierde	-	-	"
6	Río de la Reconquista	HA	L	-	C1 a C10	"
7	Arroyo Dulce	HA	LSC	PH y GS, dan LS; luego LS con Sulfa.	Dulce 1 y 2.	N.30 d.
8	Arroyo Tapalquén	HA	LSC, SC	-	-	P
		PH	L LS, LSC	- LS con Sulfa	Tapalquén 2 Tapalquén 3 y 4	90 d
9	Pozo Cnel. Rosetti	HA	C LC	- PH	Rosetti 3 y 6	N 30 d.
10	Río Pireco	PH	E, C	-	-	No se hizo
11	Lago Nahuel Huapi (V. Angostura)	HA	E, C	-	-	"
12	Lago Nahuel Huapi (P. Blest)	HA	E, C	-	-	"

Abreviaturas: L - leptospira S - espiroquetas
 E - estéril N - negativo
 P - positivo d - días
 C - otros contaminantes que no son espiroquetas.

lizadas, en el medio de Korthof, a los 10 días, aproximadamente, de incubación, prosiguiéndose hasta 1 mes en caso de ser leptospira negativos. En cada tubo se sembró 1/10 del volumen del medio, o sea 0,5 ml, del filtrado por Millipore, sembrando 3 ó 4 tubos para cada tipo de membrana.

Las observaciones en el agar de Zuelzer se realizaron como se ha expresado anteriormente.

Abreviaturas empleadas:

Rec - fecha en que la muestra fué recogida.
 Proc - " " " " " " procesada
 L - leptospiras
 L- - ausencia de leptospiras
 E - estéril
 S - espiroquetas (Se piensa que son de la familia **Treponemataceae** en general, por su longitud).
 C - otros contaminantes

Las combinaciones de símbolos empleadas indican la presencia en el cultivo de los microorganismos representados por dichos símbolos.

- - - - -

- 1) Rec. 22-V-1963 Proc. 23-V-1963
 Muestra de un lago del Parque "3 de Febrero"

Turbia y con sedimento. Centrifugado a 2.000 rpm, durante 10 min.

En agar de Zuelzer : negativo (48 días)

En Korthof con 4^o/oo de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore:

HA: 1) L S C 2) L S C 3) L S C

PH: 1) E 2) L 3) L S

GS: 1) E 2) E 3) E

- - - -

- 2) Rec. 22-V-1963 Proc. 24-V-1963
 Muestra del Río de la Plata (Altura Aeroparque)

Turbia y con sedimento. Centrifugado a 2.000 rpm durante 10 min.

En agar de Zuelzer: positivo (47 días)

En Korthof con 4^o/oo de sulfanilamida: C L-

Filtración por Millipore:

HA: 1) L S C 2) L S C 3) L S C

PH: 1) S 2) L 3) L S

GS: 1) E 2) E 3) E

- - - -

3) Rec. 16-VI-1963

Proc. 17-VI-1963

Muestra de una laguna, abrevadero de vacunos, a 6 Km de O'Higgins (Ruta 7)

En agar de Zuelzer : Positivo (51 días)

En Korthof con 4 0/oo de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S C	2) L S C	3) L S C	
PH:	1) L S C	2) L S C	3) L S C	4) L S C
GS:	1) L	2) L S	3) L S	4) L
		- - - - -		

4) Rec. 16-VI-1963

Proc. 18-VI-1963

Muestra del Río Salado. Ruta 7 (Partido de Chacabuco)

En agar de Zuelzer : Negativo (65 días)

En Korthof con 4 0/oo de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S C	2) S C	3) L S C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) E	2) L	3) L S
		- - - - -	

5) Rec. 16-VI-1963

Proc. 19-VI-1963

Muestra del Arroyo Giles (San Andrés de Giles)

En agar de Zuelzer : Positivo 49 días

En Korthof con 4 0/oo de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L C	2) L C	3) L C
PH:	1) L	2) L	3) L
GS:	1) L	2) L	3) L
		- - - - -	

6) Rec. 22-VI-1963

Proc. 25-VI-1963

Muestra del Arroyo Dulce. Estancia Devoto (Rojas)

En agar de Zuelzer : Positivo (36 días)

En Korthof con 4 0/oo de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S	2) L S C	3) L S C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) E	2) L S	3) L S
		- - - - -	

- 7) Rec. 24-VI-1963 Proc. 26-VI-1963
Muestra del Arroyo Lamela (Rojas)

En agar de Zuelzer : Positivo (35 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S C	2) L S	3) L S C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) L	2) L S	3) L S

- - - - -

- 8) Rec. 25-VI-1963 Proc. 27-VI-1963
Muestra del Arroyo Horqueta (Capitán Sarmiento)

En agar de Zuelzer : Positivo (33 días)

En Korthof con 4 ‰ de Sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S	2) L S C	3) L S C	
PH:	1) L S	2) L S	3) L S	
GS:	1) L	2) L S	3) L S	4) L S

- - - - -

- 9) Rec. 25-VI-1963 Proc. 28-VI-1963
Muestra del Río Areco (San Antonio de Areco)

En agar de Zuelzer : Positivo (34 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida: C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) L S	2) L S C	3) L S C
PH:	1) L S C	2) L S C	3) L S
GS:	1) L	2) L S	3) L S

- - - - -

- 10) Rec. 5-VI-1963 Proc. 6-VI-1963
Muestra del Arroyo Maguirre (Pcia. Buenos Aires)

En agar de Zuelzer : Positivo (32 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida : CL-

Filtración por Millipore:

HA:	1) S C	2) L S C	3) L S C
PH:	1) L S	2) L	3) L S C
GS:	1) L S	2) L	3) L

- - - - -

- 11) Rec. 5-VII-1963 Proc. 6-VII-1963
Muestra del Arroyo Helva (Arrecifes)

En agar de Zuelzer : Positivo (32 días)

En Korthof con 4% de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) L S C	2) L C	3) L S C	
PH:	1) L S	2) L S	3) L S	4) L S
GS:	1) L S	2) L S	3) L S C	4) L S
		- - - - -		

- 12) Rec. 10-VIII-1963 Proc. 12-VIII-1963
Muestra del Arroyo Tala. Km. 450 (Ruta 8), Santa Fe.

En agar de Zuelzer : Positivo (30 días)

En Korthof con 4 % de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) LC	2) LC	3) LC				
PH:	No se pudo efectuar						
GS:	1) E	2) E	3) E	4) L	5) E	6) E	7) L 8) L
			- - - - -				

- 13) Rec. 12-VIII-1963 Proc. 13-VIII-1963
Muestra del Río Luján (Luján)

En agar de Zuelzer : Positivo (29 días)

En Korthof con 4 % de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S C	2) L C	3) L S C
PH:	1) L S C	2) L S C	3) L S C
GS:	1) E	2) L S	3) L
		- - - - -	

- 14) Rec. 12-VIII-1963 Proc. 14-VIII-1963
Muestra del Arroyo del Rey (Llavallol)

En agar de Zuelzer : Positivo (28 días)

En Korthof con 4 % de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S	2) L S C	3) L C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) L	2) L S	3) L S
		- - - - -	

- 15) Rec. 19-VIII-1963 Proc. 20-VIII-1963
Muestra del Balneario de Núñez

En agar de Zuelzer : Positivo (30 días)

En Korthof con 4 ‰ de Sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) L S	2) L S	3) L S C
PH:	1) L	2) L	3) L S
GS:	1) L	2) L	3) L S
		- - - - -	

- 16) Rec. 19-VIII-1963 Proc. 21-VIII-1963
Muestra de la laguna Santa Catalina (Santa Catalina, Pcia. Buenos Aires)

En agar de Zuelzer: Positivo (29 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) L C	2) L C	3) L C
PH:	1) L	2) L	3) L
GS:	1) L	2) L	3) E
		- - - - -	

- 17) Rec. 26-VIII-1963 Proc. 27-VIII-1963
Muestra del Arroyo Conchitas, Ruta 2 (Bosques, Pcia. de Buenos Aires)

En agar de Zuelzer : Negativo (60 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida: C L-

Filtración por Millipore:

HA:	1) L S C	2) L S C	3) L S C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) L S	2) L S	3) L S
		- - - - -	

- 18) Rec. 26-VIII-1963 Proc. 28-VIII-1963
Muestra del Arroyo de las Perdices (Monte Chingolo, Pcia. de Buenos Aires)

En agar de Zuelzer : Positivo (40 días)

En Korthof con 4 ‰ de sulfanilamida : C L-

Filtración por Millipore

HA:	1) L S C	2) L S C	3) L S C
PH:	1) L S	2) L S	3) L S
GS:	1) E	2) E	3) L
		- - - - -	

En el cuadro Nº 10 condensamos los resultados obtenidos con los 3 tipos de membrana y con el medio de Zuelzer.

Cuadro Nº 10

Muestra Nº	H A			P H				G S				Desarrollo en medio de Zuelzer
	1	2	3	1	2	3	4	1	2	3	4	
1	LSC	LSC	LSC	E	L	LS	-	E	E	E	-	N
2	LSC	LSC	LSC	E	L	LS	-	E	E	E	-	P 47 d
3	LSC	LSC	LSC	LSC	LSC	LSC	LSC	L	LS	LS	L	P 51 d
4	LSC	SC	LSC	LS	LS	LS	-	E	L	LS	-	N
5	LC	LC	LC	L	L	L	-	L	L	L	-	P 49 d
6	LS	LSC	LSC	LS	LS	LS	-	E	LS	LS	-	P 36 d
7	LSC	LS	LSC	LS	LS	LS	-	L	LS	LS	-	P 35 d
8	LS	LSC	LSC	LS	LS	LS	-	L	LS	LS	LS	P 33 d
9	LS	LSC	LSC	LSC	LSC	LS	-	L	LS	LS	-	P 34 d
10	SC	LSC	LSC	LS	L	LSC	-	LS	L	L	-	P 32 d
11	LSC	LC	LSC	LS	LS	LS	LS	LS	LS	LSC	LS	P 32 d
12 ^x	LC	LC	LC	- ^x	- ^x	- ^x	- ^x	E 5)E	E 6)E	E 7)L	L 8)L	P 30 d
13	LSC	LC	LSC	LSC	LSC	LSC	-	E	LS	L	-	P 29 d
14	LS	LSC	LC	LS	LS	LS	-	L	LS	LS	-	P 28 d
15	LS	LS	LSC	L	L	LS	-	L	L	LS	-	P 30 d
16	LC	LC	LC	L	L	L	-	L	L	E	-	P 29 d
17	LSC	LSC	LSC	LS	LS	LS	-	LS	LS	LS	-	N
18	LSC	LSC	LSC	LS	LS	LS	-	E	E	L	-	P 40 d

(x) - No se realizó filtración por PH, inoculándose en cambio 8 tubos con filtrado de GS.

En esta serie de experiencias, efectuadas como se dijo con una nueva partida de membranas, se obtuvieron de todas las muestras, con poro HA, tubos con leptospira y otros microorganismos, bastante intensamente contaminados en general. Estos fueron desechados sin intentar purificarlos.

La siembra directa del agua en medio de Korthof con 4 % de sulfanilamida nunca produjo cultivos de leptospira, desarrollando intensa contaminación.

Con membranas PH, siempre se obtuvieron cultivos de leptospira, y en 6 sobre 17 ensayos se obtuvo uno o más cultivos puros. En cambio, en 4 casos se observó que en el desarrollo de los tubos inoculados con el filtrado por PH aparecen contaminantes, que no son espiroquetas.

Con membranas GS, sobre las 18 muestras ensayadas, se obtuvieron de 13 de ellas uno o más cultivos puros de Leptospira. De otros dos, la membrana retuvo todo microorganismo capaz de desarrollar en medio de Korthof, inclusive Leptospira y espiroquetas; otras dos muestras produjeron cultivos de Leptospira contaminados únicamente con espiroquetas, y en el caso restante parecen haber atravesado la membrana otro tipo de contaminantes de tamaño muy pequeño, además de las leptospiras y espiroquetas.

Esta técnica de aislamiento de cepas de aguas resulta mucho más rápida que la clásica de Zuelzer, y además la hemos hallado en ocasiones más sensibles: de las 18 muestras ensayadas se han obtenido cultivos de leptospira mediante el agar blando de Zuelzer en 15 casos, no desarrollando en los otros 3; en cambio en el medio de Korthof inoculado con los filtrados hubo siempre desarrollo de leptospiras. Similar fenómeno observó Leiguarda (144) con medio de Zuelzer y de Savino y Rennella sembrando ambos con muestras de agua previamente sometidas a filtración para decontaminarlas parcialmente, si bien sus resultados con bujías L 3 y discos Seitz EK difieren de los obtenidos por nosotros en los ensayos previos con dichos elementos filtrantes.

Dado que las membranas HA producen cultivos muy contaminados, no las consideramos adecuadas para obtener leptospiras de agua; resta considerar dos posibilidades: la primera sería obtener previamente un cultivo de Leptospira puro o no, procediendo luego a su purificación mediante una segunda filtración y/o empleo de sustancias como la sulfanilamida. En ese caso sería preferible la membrana PH

pues siempre dió cultivos de leptospira, puros o no.

La segunda posibilidad sería tomar en cuenta sólo los cultivos obtenidos puros directamente, sin intentar purificar los otros: entonces es mejor la membrana GS, pues aunque tiene mayor tendencia a retener los microorganismos contaminantes y las leptospira, ha dado, como hemos visto, cultivos puros en 13 muestras sobre 18 ensayadas, por contraste con la PH, que los produjo en 6 sobre 17.

Algunas aplicaciones de las membranas filtrantes a la purificación de cultivos contaminados

Durante el curso de este trabajo se han obtenido en muchas ocasiones cepas contaminadas. Otras veces, cepas puras se contaminaron accidentalmente, inconveniente en ciertos casos común en las tareas de laboratorio. Nuestras experiencias nos llevaron a emplear las membranas para recuperar puras dichas cepas, obteniendo en todos los casos resultados positivos con cepas de colección; en cambio, con cepas contaminadas de agua no obtuvimos siempre los efectos anteriores.

Dichos resultados indican que el éxito en la aplicación de las membranas PH y HA muy posiblemente depende del tipo de contaminante en cuestión. Con las membranas GS los resultados han sido más uniformes, pues en general sólo fallaron cuando la contaminación consistía en espiroquetas, que hemos observado con mucha frecuencia en aislamiento de leptospiras de aguas. Estas espiroquetas han podido ser eliminadas por lo común mediante sulfanilamida, como se ve más adelante.

En el Cuadro Nº 11 pueden observarse algunas pruebas realizadas; estos resultados indican la aptitud del método de purificación.

Se han colocado en la parte superior los casos en que se obtuvo purificación total de la cepa, y debajo de éstos aquellos en los que pasó contaminada o no desarrolló al sembrar el filtrado.

Cuadro Nº 11

<u>Filtro HA</u>			<u>Filtro PH</u>		
Cepa	Estado antes de filtrar	Resultado	Cepa	Estado antes de filtrar	Resultado
Pomona Suis	LC	L	C 8	LC	L
C 10	LC	L	C 4	LC	L
C 2	LC	L	C 10	LC	L
C 3	LC	L	Rosetti 3	LC	L
Pomona Johnson	LC	L	Rosetti 6	LC	L
Pomona D	LC	L	Rata 1	LC	L
Buenos Aires 2	LC	L	Dulce 1	LS	LS
Mankarso (W)	LC	L	Dulce 2	LS	LS
Rosetti 3	LC	LC	C 9	LC	LC
C 10	LC	LC	C 1	LC	LC
Dulce 2	LS	LS	C 10	LC	LC
Dulce 1	LS	LS			
Rosetti 2	LC	LC			
C 6	LC	LC			
			<u>Filtro GS</u>		
			Pomona Suis	LC	L
			Salada	LC	L
			C 6	LC	L
			C 10	LC	L
			Ranchos	LC	L
			Tapalquén 3	LSC	L
			A 1	LC	L
			A 2	LC	L
			Buenos Aires	LC	L
			B 1	LC	L
			Mitis Johnson	LC	L
			Uruguayaya	LC	L
			Salada	LC	E
			Dulce 2	LS	LS
			Dulce 1	LS	LS
			Rosetti 2	LC	E
			Dulce 1	LS	LS
			Dulce 2	LS	LS
			C 2	LC	E

Ensayos con membranas Millipore VC y VM

El tamaño de poro de estas membranas, según especificaciones de fábrica, es: VC - $100 \mu \pm 8 \mu$, y VM - $50 \mu \pm 3 \mu$. Son los dos tipos siguientes al GS ($0,22 \mu \pm 0,02 \mu$), ya empleada con resultados satisfactorios.

Al decidir el ensayo de estos filtros, tuvimos presente que en 1962, Loesche y Socransky (191) hallaron que a través de VC y VM pasan espiroquetas partiendo de material bucal. Estos autores incluso observaron el pasaje de las espiroquetas a través del filtro tipo VF (poro = $10 \mu \pm 2 \mu$), lo que atribuyen a un defecto de la membrana. En el caso de VC y VM, intervendría además la ausencia de una pared rígida celular en el sentido bacteriano ordinario, o la existencia hipotética de una "forma L" filtrable, pues el microorganismo que atravesaba la membrana era de diámetro muy superior al poro de la misma.

Hemos ensayado estas membranas con el propósito de hallar un tipo de filtro que permita únicamente el paso de las leptospiras y retenga todo otro microorganismo acompañante capaz de desarrollar en medio de Korthof. Para averiguar si las leptospiras pueden atravesarlas, antes de aplicarlas al aislamiento de cepas del agua, hemos procedido a filtrar con ellas una serie de 10 cultivos puros o contaminados.

Las filtraciones han resultado muy laboriosas, pues los filtros ofrecían gran resistencia al paso del cultivo. Por ello, procedimos luego a diluirlos con agua o solución fisiológica, alcanzando así a inocular hasta 0,5 ml en c/u de los 3 tubos utilizados en cada filtración.

De nuestras experiencias se deduce que las leptospiras no atraviesan estas membranas, o al menos, que no pueden emplearse para nuestros fines, como se vé en el Cuadro N° 12

Cuadro Nº 12

Cepa	Material a filtrar	Filtro	Observaciones de los tubos hasta 1 mes
B 6	Sin diluir. Hay espiroquetas	VC	Estéril
		VM	"
1 H 2	Diluido 1:5 Contaminado	VC	"
		VM	"
7 H 1	Puro Diluido 1:10	VC	"
		VM	"
4 H 1	Puro diluido 1:10	VC	"
		VM	"
Djasiman	Puro diluido 1:10	VC	"
		VM	"
Salada	Puro diluido 1:10	VC	"
		VM	"
C 6	Puro diluido 1:10	VC	"
		VM	"
Rosetti 3	Puro, muy rico diluido 1:20	VC	"
		VM	"
5 S 1	Puro, muy rico diluido 1:20	VC	"
		VM	"
6 H 2	Contaminado diluido 1:20	VC	"
		VM	"

Purificación mediante sulfanilamida

Durante el estudio comparativo de los tipos de membranas HA, PH y GS fueron obtenidos numerosos cultivos contaminados; además, se tenían cepas aisladas anteriormente, algunas de las cuales sólo habían podido ser parcialmente purificadas mediante filtraciones. Hemos intentado purificar éstas, y los cultivos obtenidos contaminados de las primeras doce muestras del estudio comparativo mencionado, correspondientes a las membranas PH y GS.

Los contaminantes más frecuentemente observados, como se vé en el cuadro Nº 10, son espiroquetas, de espiras mucho más abiertas y profundas que en las leptospiras, y que no hemos visto desarrollar

Cuadro Nº 13

Cepa	Estado anterior	Acción de la Sulfanilamida	Control en Tio-glicolato	Cepa	Estado anterior	Acción de la Sulfanilamida	Control en Tio-glicolato
1H2	L	-	Estéril	8H1	LS	purificado	estéril
1H3	LS	purificado	"	8H2	LS	"	"
2H2	L	-	"	8H3	LS	"	"
2H3	L	-	"	8S1	L	-	"
3H1	LSC	purificado	"	8S2	LS	purificado	"
3H2	LSC	"	"	8S3	LS	(purificado en	"
3H3	LSC	"	"			(2 pasajes	
3H4	LSC	"	"	8S4	LS	purificado	"
3S1	L	-	"	9H1	LSC	"	"
3S2	LS	purificado	"	9H2	LSC	"	"
3S3	LS	"	"	9H3	LS	"	"
3S4	L	-	"	9S1	L	-	"
4H1	LS	purificado	"	9S2	LS	purificado	"
4H2	LS	(purificado en	"	9S3	LS	"	"
		(2 pasajes		10H1	LS	"	"
4H3	LS	"	"	10H3	LSC	"	"
4S2	L	-	"	10S1	LS	"	"
4S3	LS	purificado	"	11H1	LS	"	"
5H1	L	-	"	11H2	LS	"	"
5H2	L	-	"	11H3	LS	"	"
5H3	L	-	"	11H4	LS	"	"
5S1	L	-	"	11S1	LS	"	"
5S2	L	-	"	11S2	LS	"	"
5S3	L	-	"	11S3	LSC	"	"
6H1	LS	(purificado en	"	11S4	LS	inhibición del	-
		(2 pasajes				desarrollo	
6H2	LS	"	"	12S4	L	-	estéril
6H3	LS	"	"	12S7	L	-	"
6S2	LS	purificado	"	12S8	L	-	"
6S3	LS	"	"	B5	LS	no purifica	"(x)
7H1	LS	"	"	B6	LS	"	"(x)
7H2	LS	"	"	B7	LS	"	"(x)
7H3	LS	"	"	Dulce 1	LS	purificado	"
7S1	L	-	"	Dulce 2	LS	"	"
7S2	LS	purificado	"	Tapalquén 3	LS	"	"
7S3	LS	"	"	Tapalquén 4	LS	"	"

(x) Se observan las espiroquetas en el medio de Korthof sin sulfanilamida (próximo repique).

en los controles efectuados con agar de Zuelzer, modificado por Korchine-Erber, en el que el verde brillante del medio original está reemplazado por sulfanilamida. Ello nos indujo a pensar que estas espiroquetas filtrables podían ser inhibidas por la sulfanilamida,

la cual no actúa según Stavitsky (166) sobre las leptospiras saprófitas y patógenas en una concentración de 4 g por litro de medio de Vervoort modificado.

También Červa ha logrado ciertos éxitos con el empleo de distintas sulfas (citado por (172)).

A fin de identificar más simplemente cada cultivo, hemos designado con el primer número a la muestra de origen; luego con la letra S a los que fueron obtenidos por filtración con GS, y con la letra H a los que lo fueron con membrana PH; para terminar, un número final indica el número de orden del tubo inoculado con el filtrado. Así, "4S3" significa el cultivo proveniente del tercer tubo inoculado con filtrado por GS de la muestra de agua N^o 4.

Los resultados de estas purificaciones se hallan en el cuadro N^o 13. Se incluyen también controles de esterilidad de cepas no purificadas por haberse aislado ya en estado de pureza.

La ausencia de contaminantes fué verificada inoculando una gota del cultivo en medio de tioglicolato, y mediante observaciones al microscopio de fondo oscuro del propio cultivo. Hemos visto que en tres oportunidades en que la sulfanilamida no eliminó las espiroquetas contaminantes, éstas no desarrollaron en el tioglicolato, aunque fueron fácilmente observadas en el medio de Korthof.

En algunos casos fué necesario efectuar dos pasajes por medio con sulfanilamida, antes de lograr purificar la cepa, observando en otros una inhibición parcial del desarrollo de las leptospiras, que no llegaban a crecer abundantemente, haciéndolo en cambio en repiques posteriores en medio sin sulfanilamida. En un caso la inhibición fué total.

Pruebas de diferenciación de leptospiras saprófitas y patógenas

A medida que fueron obteniéndose las cepas purificadas, se las fué sometiendo, como primera orientación, a las pruebas de diferenciación. Se comenzó con las propuestas por Mailloux y Kolochine-Erber por una parte, y por Babudieri y Zardi por otra, aplicándolas a 9 cepas aisladas por nosotros y los correspondientes controles de cepas patógenas y biflexas conocidas.

Como se aprecia en el Cuadro N^o 14, en el que se representan los resultados obtenidos, el comportamiento de muestras cepas en tales ensayos ha sido dudoso: debemos aclarar que en todas ellas hemos observado que casi todos los microorganismos carecían de movilidad en esos medios, y parecían muertos, mientras que el control de la cepa biflexa exhibía un número grande de leptospiras activamente móviles.

Tales resultados, y la mayor complejidad y duración de estos ensayos nos decidieron a no emplearlos para las demás cepas aisladas, utilizando en cambio el método de Fúzi y Csóka del SO_4Cu para todas las cepas puras conservadas. Esta prueba es de realización más fácil y rápida, pero, sin embargo, hemos tenido 13 cepas cuyo comportamiento ha sido dudoso (desarrollo en 1:100.000 y no en 1:40.000) y otras 5 que no desarrollaron en esas diluciones aún en repetidos intentos, como ocurre con las cepas patógenas.

Los resultados obtenidos en las correspondientes observaciones microscópicas del desarrollo se resumen en el Cuadro N^o 15

Debemos hacer notar que algunas de estas cepas de comportamiento análogo a las patógenas han sido y continuaran siendo estudiadas por el Equipo de Leptospirosis de este Instituto, aplicando otras pruebas diferenciales en estudio, basadas en la inhibición del desarrollo por acción de colorantes. (192)

Podría intervenir en esta facilidad en la inhibición, el hecho de que estas cepas solían crecer con dificultad cuando fueron estudiadas, poco después de haberlas aislado.

Cuadro Nº 14

Pruebas de Mailloux y Kolochine-Erber y de Babudieri y Zardi

Capi- tulo	Día	Medio	C e p a s										
			B1	B2	B3	C2	C6	C10	Sala da	A1	A2	WaZ	M20
1º	3º	A	2 1	3 4	1 2	1 1	4 4	3 2	3 2	1 1	1 0	10 10	1 0
		B	4 3	4 4	3 3	1 1	3 3	2 2	4 4	1 1	1 2	10 10	0 0
	5º	A	2 4	4 4	3 3	1 1	4 4	4 4	3 2	2 4	4 0	10 10	0 0
		B	4 4	4 4	3 4	2 2	4 4	3 2	2 4	0 1	0 1	10 10	0 0
	7º	A	4 5	4 4	4 4	1 1	4 4	3 2	2 1	5 6	1 0	10 10	0 0
		B	5 3	4 4	2 4	1 2	4 4	3 1	2 3	1 1	0 1	10 10	0 0
2º	3º	A	2 3	2 2	2 2	1 0	4 3	2 1	2 1	4 6	1 1	8 9	
		B	3 2	2 2	3 3	2 1	3 3	1 4	1 0	6 1	1 1	8 9	
	5º	A	4 4	3 5	3 3	2 1	5 5	2 2	2 1	4 4	0 1	9 9	
		B	4 5	2 2	4 4	1 1	5 5	2 1	1 1	1 0	1 1	8 8	
	7º	A	4 4	2 3	1 2	1 0	4 5	1 2	2 1	6 5	1 3	8 7	
		B	5 5	1 2	4 4	1 1	3 2	3 2	1 1	1 0	2 2	7 7	
3º	3º	A	1 1	1 2	1 0	0 0	1 1	0 0	1 1	0 0	1 0	5 5	
		B	1 2	0 1	1 1	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	
	5º	A	2 1	1 1	1 0	0 0	1 1	0 0	1 0	0 0	1 0	1 5	
		B	1 3	1 1	1 1	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	0 0	1 1	
	7º	A	1 1	1 1	1 0	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	1 0	1 1	
		B	1 2	1 1	2 2	0 0	1 1	0 0	0 0	0 0	1 1	1 1	

(sigue)..

A - medio de Korthof modificado por Babudieri y Zardi

B - medio de Stuart modificado por Mailloux y Kolochine-Erber

Los números representan la riqueza relativa de los cultivos.

Cuadro Nº 14 (cont.)

C e p a s

Rep ¹ que	Día	Medio	B1	B2	B3	C2	C6	C10	Sala- da	A1	A2	WaZ	M20
			0	0	0		0				0	0	
	3 ^o	A	0	0	0		0				0	0	
		B	0	0	0		0				0	0	
			0	0	0		0				0	0	
4 ^o	5 ^o	A	0	0	0		0				0	0	
			0	0	0		0				0	0	
		B	0	0	0		0				0	0	
			0	0	0		0				0	0	
	7 ^o	A	0	0	0		0				0	0	
			0	0	0		0				0	0	
		B	0	0	0		0				0	0	
			0	0	0		0				0	0	

Cuadro Nº 15

Desarrollo de Leptospiras en el medio de Korthof-Fizi-Csóka

Cepa	Dilución del SO ₄ Cu			
	1:30.000	1:40.000	1:100.000	1:200.000
A 1	P	P	P	P
A 2	P	P	P	P
B 1	P	P	P	P
B 2	N	P	P	P
B 3	P	P	P	P
C 1	P	P	P	P
C 2	P	P	P	P
C 3	P	P	P	P
C 4	P	P	P	P
C 5	P	P	P	P
C 6	P	P	P	P
C 7	P	P	P	P
C 8	P	P	P	P
C 9	P	P	P	P
C 10	P	P	P	P
Salada	N	N	N	N
Dulce 1	N	P	P	P
Dulce 2		N	P	
Rosetti 3		P	P	
Rosetti 6		P	P	
Tapalquón 2		P	P	
Tapalquón 3		P	P	
Tapalquón 4		P	P	
1 H 2		P	P	
1 H 3		P 5 ^o d		
2 H 2		P	P	
2 H 3		P	P	
3 H 1	P 5 ^o d	P 5 ^o d		P
3 H 2	N	N		P
3 H 3	N	P 5 ^o d		P
3 H 4	P 5 ^o d	P 5 ^o d		P
3 S 1		P		
3 S 2	P 7 ^o d	P 7 ^o d	P 7 ^o d	P
3 S 3	N	N	P	P
3 S 4		N	P	
4 H 1	N	N	P 5 ^o d	P
4 H 2	N	N	N	P 5 ^o d
4 H 3	N	N	P	P
4 S 1	N	N	N	P 5 ^o d
5 H 1		N	P	
5 H 2	N	N	N	P 5 ^o d
5 H 3		N	P	
5 S 1		P	P	
5 S 2		N	P 5 ^o d	
5 S 3	N	N	P	P
5 S 4	N	N	P	P
6 H 1	N	N	P	P
6 H 2	N	N	P	P
6 H 3	N	N	P	P
6 S 1	N	N	P	P
6 S 2	N	N	P	P
6 S 3	N	N	P	P
7 H 1	P 7 ^o d	P 7 ^o d		P
7 H 2	P 7 ^o d	P		P
7 H 3		P 5 ^o d		P
7 S 1		P		P
7 S 2		P		P
7 S 3		P		P
8 H 1		P		P
8 H 2		P		P

Cuadro N° 15 (cont.)

Dilución del SO₄Cu

Copa	1:30.000	1:40.000	1:100.000	1:200.000
8 H 3		P		P
8 S 1		P 5º d		P
8 S 2		P		P
8 S 3		P 5º d		P
8 S 4		P 7º d		P
9 H 1		N	P 7º d	
9 H 2		P		P
9 H 3		P		P
9 S 1		P		P
9 S 2		P 5º d		P
9 S 3		P		P
10 H 1		P		P
10 H 3		P 5º d		P
10 S 1		P 7º d		P
11 H 1		N		P
11 H 2		P		P
11 H 3		P 7º d		P
11 H 4		N		P
11 S 1		P		P
11 S 2		N		P
11 S 3		P		P
12 S 4		P		P
12 S 7		P		P
12 S 8		P		P

C o n t r o l e s

Autumnalis (AB)		N		N
Akiyami A		N		N
Pyrogenes Salinem	N	N		N
L.i.h. AB M20	N	N		N
Pomona	N	N		N
Wa Gent		P		P
Wa Z	P 5º d	P		P
Wa Leiden	N	P 7º d		P
Patoc 1	P 7º d	P		P

P - Desarrollo

P 5º d - id. al 5º día

N - No hay desarrollo.

Estudio suerológico

Fueron examinadas las relaciones suerológicas existentes entre 25 cepas aisladas por nosotros (con 15 de las cuales hemos preparado también los sueros hiperinmunes), y las colecciones de sueros y de cepas biflexas y patógenas según los métodos que hemos descrito.

Un serio obstáculo hallado desde un principio en la ejecución de las pruebas fué ocasionado por el hecho de que algunas cepas mostraban una fuerte tendencia a autoaglutinarse, fenómeno observado en los tubos testigo y también en el portaobjetos al realizar las lecturas. Esta situación no variaba empleando como diluyentes soluciones buffer de pH comprendidos entre 4,60 y 8,80, con intervalos de 0,20 unidades.

Por el contrario, utilizando antígenos formolados al 5 %, una vez eliminadas por centrifugación las aglutinaciones preexistentes, éstas no se reproducían más. Mediante los antígenos muertos pudimos así realizar determinaciones preliminares, comprobando en varios casos que cepas aisladas de una misma muestra de agua eran antigénicamente distintas. Cuando las cepas pudieron emplearse para la preparación de antígenos vivos satisfactorios, luego de una larga serie de repiques, estos resultados fueron confirmados.

Por eso, hemos deseado averiguar, dentro de ciertas posibilidades, no sólo qué relaciones existen entre leptospiras de diversas procedencias, sino también con cuánta frecuencia las cepas obtenidas de distintas porciones del filtrado de una misma muestra de agua se comportan suerológicamente de modo diferente, sea frente a sus sueros o a los de otras cepas, y viceversa, lo que nos daría una idea sobre las variedades que pueden coexistir en una muestra. Así, hemos incluido en este estudio las cepas A 1 y A 2; C 6 y C 10; B 1, B 2 y B 3; Rosetti 6 y 3; 4 S 3, 4 H 1 y 4 H 2; 5 H 2 y 5 S 1; 6 S 2 y 6 H 2; 3 H 2 y 3 S 2; Tapalquén 2, 3 y 4; además de Salada, Dulce 2, 7 H 1 y 9 H 1.

La elección de estos grupos de cepas fué hecha de tal modo que quedasen comprendidas también aquellas que frente a las sales de

cobre, en las pruebas de Mizi y Csóka, se habían comportado como patógenas, así como varias de las que no desarrollaron en diluciones 1:40.000, pero lo hicieron en 1:100.000.

El resultado de las pruebas de microaglutinación cruzada puede observarse en los cuadros Nº 16 a Nº 41 .

En el cuadro Nº 42 se exponen en conjunto todas las relaciones suerológicas halladas entre muestras cepas, así como entre ellas y las cepas biflexas de la colección de este Instituto, expresadas en porcentaje del título homólogo (T) de cada suero en las pruebas de microaglutinación. Excluimos de este último cuadro los resultados obtenidos en las reacciones realizadas frente a los sueros y cepas patógenas, pues han sido casi siempre negativos, y en cambio se incluyen las relaciones halladas entre las cepas Buenos Aires y Buenos Aires 2, y entre semaranga R S 173, Sao Paulo y Patoc 1, puesto que están vinculadas con algunas de muestras cepas.

C U A D R O N^o 16Títulos de los sueros hiperinmunes empleadosCepa

bataviae Swart	> 1/10.000
icterohaemorrhagiae AB M20	id.
javanica Veldrat, Batavia 46	id.
canicola Hond Utrecht IV	id.
ballum Mus 127	id.
pyrogenes Salinem	1/20.000
cynopteri 3522C	> 1/10.000
scentot Scentot.	- id.
autumnalis AB Akiyami A	1/6.000
djasinan Djasinan	1/70.000
australis Ballico	> 1/10.000
pomona Pomona	id.
grippotyphosa Moskva V	id.
hebdomadis Hebdomadis	id.
hyos Mitis Johnson	id.
celledoni Celledoni	- id.
Rachmat (Autumnalis A)	1/60.000
Moores	1/20.000
Bankinang I	1/30.000
andaman A C.H. 11	1/3.000
semaranga Rat Semarang 173	1/3.000
Ranchos	1/10.000
Buenos Aires	1/15.000
Buenos Aires 2	1/30.000
Patoc 1	1/3.000
Sao Paulo	1/100.000
Wa Gent	1/10.000
Wa Z	1/40.000
Wa Leiden	1/50.000
A 1	1/15.000
A 2	1/20.000
C 6	1/30.000
C 10	1/5.000
Salada	1/300.000
B 1	1/10.000
B 2	1/30.000
Rosetti 6	1/30.000
Tapalquén 3	1/10.000
Tapalquén 4	1/15.000
Dulce 2	1/100.000
4 S 3	1/10.000
5 H 2	1/5.000
6 S 2	1/50.000
9 H 1	1/7.000

CUADRO Nº 17

	Cepa A l/Sueros	Suero A l/Cepas
bataviae	0	0
heterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	1:15.000	1:15.000
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	1:100	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	0
Tapalquén 3	0	0
Tapalquén 4	0	1:500
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 18

Cepa A 2/Sueros

Suero A 2/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	1:20.000	1:20.000
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	0
Tapalquén 3	1:100	0
Tapalquén 4	1:100	0
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 19

Cepa C 6/Sueros Suero C 6/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
hallium	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	1:10,000	1:500
Wa Z	0	0
Wa Leiden	1:100	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	1:30,000	1:30,000
C 10	1:1000	1:100
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	0
Tapalquén 3	1:100	0
Tapalquén 4	1:100	0
Dulce 2	0	0
4 S 3	1:500	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	1:500
9 H 1	0	0

C U A D R O N° 20

Cepa C 10/Sueros Suero C 10/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
banicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	1:1000	1:300
Buenos Aires 2	1:1000	1:200
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	00	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	1:100	1:1000
C 10	1:5000	1:5000
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	0
Tapalquén 3	1:100	0
Tapalquén 4	1:1000	0
Dulce 2	0	0
4 S 3	1:500	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 21

Cepa Salada/Sueros Suero Salada/Cepas

bataviae	0	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0	0
javanica	0	0	0
canicola	0	0	0
ballum	0	0	0
pyrogenes	1:500	0	0
cynopteri	0	0	0
sentot	0	0	0
autumnalis	1:100	0	0
Rachmat	1:3000	0	0
Moores	0	0	0
Bankinang	0	0	0
djasiman	1:1000	0	0
australis	0	0	0
pomona	0	0	0
grippotyphosa	0	0	0
hebdomadis	0	0	0
hyos	0	0	0
celledoni	0	0	0
andaman A	0	0	0
semaranga	0	0	0
Ranchos	0	0	0
Buenos Aires	0	0	0
Buenos Aires 2	0	0	0
Patoc 1	0	0	0
Sao Paulo	0	0	0
Wa Gent	0	0	0
Wa Z	0	0	0
Wa Leiden	0	0	0
A 1	0	0	0
A 2	0	0	0
C 6	0	0	0
C 10	0	0	0
Salada	1:300.000	1:300.000	1:300.000
B 1	0	0	0
B 2	0	0	0
Rosetti 6	0	1:100	0
Tapalquén 3	0	0	0
Tapalquén 4	1:5000	0	0
Dulce 2	0	0	0
4 S 3	0	0	0
5 H 2	0	0	0
6 S 2	0	0	0
9 H 1	0	0	0

C U A D R O N° 22

Cepa B 1/Sueros

Suero B 1/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	1:100
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	1:100
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	1:100
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	1:10.000	1:10.000
B 2	1:10.000	1:10.000
Rosetti 6	0	1:100
Tapalquén 3	0	1:100
Tapalquén 4	0	0
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

C U A D R O N° 23

Cepa B 2/Sueros

Suero B 2/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	1:100
Sao Paulo	0	1:500
Wa Gent	0	0
Wa T	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	1:10.000	1:10.000
B 2	1:30.000	1:30.000
Rosetti 6	0	1:100
Tapalquén 3	0	0
Tapalquén 4	0	1:300
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	1:300
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 24

Cepa Rosetti 6/Sueros Suero Rosetti 6/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	1:5000	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	1:100	0
B 1	1:100	0
B 2	1:100	0
Rosetti 6	1:30.000	1:30.000
Tapalquén 3	1:2000	1:1000
Tapalquén 4	1:100	1:100
Dulce 2	1:100	0
4 S 3	1:500	0
5 H 2	1:100	0
6 S 2	1:100	0
9 H 1	0	0

C U A D R O N° 25

Cepa Tapalquén 3/Sueros Suero Tapalquén 3/Cepas

batavinae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	1:500
Buenos Aires 2	0	1:500
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	1:100
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	1:100
A 1	0	0
A 2	0	1:100
C 6	0	1:100
C 10	0	1:100
Salada	0	0
B 1	1:100	0
B 2	0	0
Rosetti 6	1:1000	1:2000
Tapalquén 3	1:10.000	1:10.000
Tapalquén 4	1:500	1:1000
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	1:100	0
9 H 1	1:1000	1:2000

C U A D R O N° 26

Cepa Tapalquén 4/Sueros Suero Tapalquén 4/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	1:500	1:1000
Buenos Aires 2	1:500	1:1000
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	1:1000
Wa Gent	1:100	1:100
Wa Z	1:100	1:100
Wa Leiden	0	0
A 1	1:500	0
A 2	0	1:100
C 6	0	1:100
C 10	0	1:1000
Salda	0	1:5000
B 1	0	0
B 2	1:300	0
Rosetti 6	1:100	1:100
Tapalquén 3	1:1000	1:500
Tapalquén 4	1:15.000	1:15.000
Dulce 2	1:200	1:500
4 S 3	1:200	1:300
5 H 2	1:500	0
6 S 2	0	1:100
9 H 1	1:100	0

C U A D R O N° 27

	Cepa Dulce 2/Sueros	Suero Dulce 2/Cepas
bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippothyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
colledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	1:15.000	1:5.000
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	1:100
Tapalquén 3	0	0
Tapalquén 4	1:500	1:200
Dulce 2	1:100.000	1:100.000
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	1:500	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 28

Cepa 4 S 3/Sucros

Suero 4 S 3/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
caledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Pator 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	1:100
Wa Z	1:500	1:1000
Wa Leiden	0	1:500
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	1:500
C 10	0	1:500
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	1:500
Tapalquén 3	0	0
Tapalquén 4	1:300	1:200
Dulce 2	0	0
4 S 3	1:10,000	1:10,000
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 29

Cepa 5 H 2/Sueros

Suero 5 H 2/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	1:2000	1:4000
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	1:600	1:4000
Sao Paulo	1:10.000	1:4000
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	1:300	0
Rosetti 6	0	1:100
Tapalquén 3	0	0
Tapalquén 4	0	1:500
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	1:5000	1:5000
6 S 2	0	0
9 H 1	0	0

CUADRO Nº 30

Cepa 6 S 2/Sucros

Suero 6 S 2/Cepas

bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	0	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	0	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	1:500	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	1:100
Tapalquén 3	0	1:100
Tapalquén 4	1:100	0
Dulce 2	0	1:500
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	1:50.000	1:50.000
9 H 1	0	0

C U A D R O N° 31

	Cepa 9 H 1/Sueros	Suero 9 H 1/Cepas
bataviae	0	0
icterohaemorrhagiae...	0	0
javanica	0	0
canicola	0	0
ballum	0	0
pyrogenes	0	0
cynopteri	0	0
sentot	0	0
autumnalis	0	0
djasiman	0	0
australis	1:500	0
pomona	0	0
grippotyphosa	0	0
hebdomadis	0	0
hyos	0	0
celledoni	0	0
andaman A	0	0
semaranga	0	0
Ranchos	1:100	0
Buenos Aires	0	0
Buenos Aires 2	0	0
Patoc 1	0	0
Sao Paulo	0	0
Wa Gent	0	0
Wa Z	0	0
Wa Leiden	0	0
A 1	0	0
A 2	0	0
C 6	0	0
C 10	0	0
Salada	0	0
B 1	0	0
B 2	0	0
Rosetti 6	0	0
Tapalquén 3	1:2000	1:1000
Tapalquén 4	0	1:100
Dulce 2	0	0
4 S 3	0	0
5 H 2	0	0
6 S 2	0	0
9 H 1	1:7000	1:7000

CUADRO Nº 32

Cepa Tapalquén 2/Sueros

bataviae	0
icterohaemorrhagiae	0
javanica	0
canicola	0
ballum	0
pyrogenes	0
cynopteri	0
sentot	0
autumnalis	0
djasiman	0
australis	0
pomona	0
grippotyphosa	0
hebdomadis	0
hyos	0
celledoni	0
andaman A	0
semaranga	0
Ranchos	0
Buenos Aires	1:1000
Buenos Aires 2	1:1.000
Patoc 1	0
Sao Paulo	0
Wa Gent ..	0
Wa Z	0
Wa Leiden	0
A 1	1:500
A 2	1:100
C 6	0
C 10	0
Salada	1:100
B 1	1:100
B 2	0
Rosetti 6	0
Tapalquén 3	1:300
Tapalquén 4	1:5.000
Dulce 2	1:100
4 S 3	0
5 H 2	1:100
6 S 2	0
9 H 1	1:100

No se preparó
el inminosuero
de esta cepa.

C U A D R O N^o 33

Cepa Rosetti 3/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inminosuero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae ...	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	1:500	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	1:100	
B 1	1:100	
B 2	0	
Rosetti 6	1:30.000	
Tapalquén 3	1:5.000	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	1:100	
4 S 3	0	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	0	

C U A D R O N^o 34

Cepa B 3/sueros

bataviae	0	No se preparó el inmunosuero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	0	
Tapalquén 3	0	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	1:300	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	0	

CUADRO N° 35

Cepa 3 H 2/Sueros

No se preparó
el inminosuero
de esta cepa.

Bataviae	0
icterohaemorrhagiae	0
javanica	0
canicola	0
ballum	0
pyrogenes	0
cynopteri	0
sentot	0
autumnalis	0
djasiman	0
australis	0
pomona	0
grippotyphosa	0
hebdomadis	0
hyos	0
celledoni	0
andaman A	0
semaranga	0
Ranchos	0
Buenos Aires	0
Buenos Aires 2	0
Patoc 1	0
Sao Paulo	0
Wa Gent	0
Wa Z	0
Wa Leiden	0
A 1	0
A 2	0
C 6	0
C 10	0
Salada	0
B 1	0
B 2	1:300
Rosetti6	0
Tapalquén 3	0
Tapalquén 4	0
Dulce 2	0
4 S 3	0
5 H 2	0
6 S 2	0
9 H 1	0

CUADRO Nº 36

Cepa 3 S 2/Sueros

No se preparó
el inminosuero
de esta cepa.

batavine	0
icterohaemorrhagiae ...	0
javanica	0
canicola	0
ballum	0
pyrogenes	0
cynopteri	0
sentot	0
autumnalis	0
djasinan	0
australis	0
ponona	0
grippotyphosa	0
hebdenadis	0
hyos	0
celledoni	0
andanan A	0
senaranga	0
Ranchos	0
Buenos Aires	0
Buenos Aires 2	0
Patoc 1	0
Sao Paulo	0
Wa Gent	0
Wa Z	0
Wa Leiden	0
A 1	0
A 2	0
C 6	0
C 10	0
Salada	0
B 1	0
B 2	1:100
Rosetti 6	0
Tapalquén 3	0
Tapalquén 4	0
Dulce 2	0
4 S 3	0
5 H 2	0
6 S 2	0
9 H 1	0

CUADRO Nº 37

Cepa 7 H 1/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inmunosiero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hycs	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	1:100	
Tapalquén 3	0	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	0	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	1:300	

CUADRO Nº 37

Cepa 7 H 1/Sueros

bataviao	0	No se preparó el inmunosuero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopecteri	0	
senkot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hycs	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	1:100	
Tapalquén 3	0	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	0	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	1:300	

C U A D R O N° 38

Cepa 6 H 2/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inmunosuero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae	0	
javanica ..	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	1:100	
semaranga	0	
Ranchos	1:300	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	1:3000	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	0	
Tapalquén 3	0	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	1:1000	
4 S 3	0	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	0	

C U A D R O N^o 39

Cepa 5 S 1/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inmunosuero de esta cepa
icterohaemorrhagiae	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	1:4000	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	1:1000	
Sao Paulo	1:20,000	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	0	
Tapalquén 3	0	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	0	
5 H 2	1:8000	
6 S 2	0	
9 H 1	0	

C U A D R O N°40

Cepa 4 H 2/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inminosuero de esta cepa
icterohaemorrhagiae	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum.....	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	0	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	0	
Tapalquén 3	1:300	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	0	
5 H 2	0	
6 S 2	0	
9 H 1	1:3000	

C. U A D R O N^o 4I

Cepa 4 H 1/Sueros

bataviae	0	No se preparó el inminosuero de esta cepa.
icterohaemorrhagiae ...	0	
javanica	0	
canicola	0	
ballum	0	
pyrogenes	0	
cynopteri	0	
sentot	0	
autumnalis	0	
djasiman	0	
australis	0	
pomona	0	
grippotyphosa	0	
hebdomadis	0	
hyos	0	
celledoni	0	
andaman A	0	
semaranga	0	
Ranchos	0	
Buenos Aires	0	
Buenos Aires 2	0	
Patoc 1	0	
Sao Paulo	0	
Wa Gent	0	
Wa Z	0	
Wa Leiden	0	
A 1	0	
A 2	0	
C 6	1:100	
C 10	0	
Salada	0	
B 1	0	
B 2	0	
Rosetti 6	0	
Tapalquén 3	1:300	
Tapalquén 4	0	
Dulce 2	0	
4 S 3	1:100	
5 H 2	0	
6 S 2	1:10.000	
9 H 1	1:300	

Resultados de los estudios suerológicos realizados

Sobre la base de los resultados obtenidos examinaremos las relaciones antigénicas halladas entre las distintas cepas, de igual o distinto origen.

Veremos primeramente qué vinculaciones y diferencias hemos encontrado entre cepas provenientes de una misma muestra de agua.

Las cepas A₁ y A₂ han resultado diferentes, y no están estrechamente vinculadas con ninguna otra cepa ensayada.

Respecto a las cepas C₆ y C₁₀, las relaciones más notables en las reacciones de microaglutinación cruzada son las que siguen:

Cepas	-Sueros-		
	C ₆	C ₁₀	Wa Gent
C ₆	T	20	100
C ₁₀	0,3	T	0
Wa Gent	1,7	0	T

Estas cepas son obviamente diferentes, y hemos tenido oportunidad de confirmarlo mediante las pruebas de adsorción siguientes:

Suero	adsorbido por cepa	frente a cepa	-d i l u c i ó n-			
			1:10	1:50	1:100	1:200
C ₁₀	C ₆	C ₆	N	N	N	N
"	"	C ₁₀	P	P	P	P
Wa Gent	C ₆	C ₆	N	N	N	N
" "	"	Wa Gent	P	P	P	N

Las cepas B₁, B₂ y B₃ exhiben las siguientes relaciones :

Cepas	-Sueros-	
	B ₁	B ₂
B ₁	T	33
B ₂	100	T
B ₃	0	0

Estos resultados indican que B₃ es independiente, pero en cambio B₁ resulta ser igual a B₂, como se deduce de las siguientes pruebas de adsorción cruzada :

-D i l u c i ó n-

Suero	adsorbido		frente a cepa	Dilución			
	por	cepa		1:10	1:50	1:100	1:200
B1	B2	B2	N	N	N	N	
"	"	B1	N	N	N	N	
B2	B1	B1	N	N	N	N	
"	"	B2	N	N	N	N	

Con las cepas Rosetti 3 y Rosetti 6 no hemos podido realizar pruebas de adsorción, pero es verosímil suponer que son idénticas o muy similares :

-S u e r o s-

Cepas	Rosetti 6	Tapalquén 3	Wa Gent
Rosetti 3	100	50	5
Rosetti 6	T	20	50

reaccionando a títulos muy bajos o nulo frente a los demás sueros ensayados.

El grupo 4S3, 4H1 y 4H2 está relacionado del siguiente modo :

-S u e r o s-

Cepas	4S3	6S2	9H1
4S3	T	0	0
4H1	1	20	4,3
4H2	0	0	43

de lo cual deducimos que 4H2 y 4H1 son diferentes de 4S3 y muy posiblemente también diferentes entre sí.

Particular interés revisten las relaciones entre las cepas 5H2, 5S1, Patoc 1, Sao Paulo y semaranga RS173, que hemos hallado vinculadas entre sí:

-S u e r o s-

Cepas	5H2	Sao Paulo	Patoc 1	RS173
5H2	T	10	20	67
5S1	150	20	33	133
Sao Paulo	80	T	200	100
Patoc 1	80	30	T	67
R.S. 173	80	10	20	T

Repetidas determinaciones han señalado una mayor aglutinabilidad de 5S1 que de 5H2, pero es muy posible que su composición antigénica sea la misma. Estas cepas serán estudiadas más a fondo por este Instituto.

Hemos hallado las siguientes relaciones entre las cepas

del Arroyo Tapalquén:

- S u e r o s -

Cepas	Tapalquén 3	Tapalquén 4	5H2	9H1	Bs.As.	Bs.As.2
Tapalquén 2	3	33	2	1,4	6,7	3,3
Tapalquén 3	T	3,3	0	1,4	0	0
Tapalquén 4	10	T	10	1,4	3,3	1,7

y hemos comprobado que Tapalquén 3 difiere de Tapalquén 4 mediante las siguientes pruebas de adsorción cruzada :

Suero	Adsorbido por cepa	Frente a cepa	-d i l u c i ó n-			
			1:10	1:50	1:100	1:200
Tapalquén 3	Tapalquén 4	Tapalquén 4	N	N	N	N
Tapalquén 3	Tapalquén 4	Tapalquén 3	P	P	P	P
Tapalquén 4	Tapalquén 3	Tapalquén 3	N	N	N	N
Tapalquén 4	Tapalquén 3	Tapalquén 4	P	P	P	<u>P</u>

Por otra parte, las reacciones de microaglutinación indicarían la vinculación existente entre Tapalquén 2 y 4, que probablemente son idénticas.

Se puede afirmar que 6H2 difiere de 6S2, pues el suero de esta última (T = 1:50,000) no aglutina a la primera, la cual, por otra parte, es aglutinada por el suero anti-A₂, que no reacciona con la cepa 6S2:

Cepas	-Sueros-	
	6S2	A2
6S2	T	0
6H2	0	15

Por el contrario, nada podemos asegurar sobre 3H2 y 3S2 puesto que prácticamente no reaccionaron con ningún suero ensayado, y no hemos podido preparar los sueros correspondientes a estas cepas.

Conviene indicar que se han encontrado algunas relaciones asimétricas en microaglutinaciones cruzadas entre las cepas estudiadas y los sueros disponibles. A continuación señalamos solamente aquellos valores que muestran tales asimetrías, y otros aún no mencionados que representan vinculaciones de consideración, por tener lugar a porcentajes relativamente altos del título homólogo:

-S u e r o s-

Cepas	9H1	Tapalquén 3	Rosetti 6	WaGent
9H1	T	20		
Tapalquén 3	14	T	3,3	
Rosetti 6		20	T	50
Rosetti 3		50	100	5
Wa Gent			0	T
4H2	43			

-Sueros-			-Sueros-		
Cepas	Salada	Tapalquén 4	Cepas	Dulce 2	Ranchos
Salada	T	33	Dulce 2	T	150
Tapalquén 4	0	T	Ranchos	5	T

Suero	
Cepa	6S2
4H1	20
6S2	T

Suero	
Cepa	A2
6H2	15
A2	T

Durante la realización de las primeras pruebas de microaglutinación, empleamos en algunos casos, para orientación, antígenos formolados, pues, como se ha expresado, ello permitía con frecuencia trabajar con cepas que de otro modo aglutinaban espontáneamente. Procediendo de tal manera con la cepa "Salada", se observaron repetidamente fenómenos de aglutinación a valores de hasta 10% del título homólogo con el suero anti-Akiyari A (autumnalis AB). Se examinaron por lo tanto posteriormente las relaciones existentes con los otros suerotipos de ese suerogrupo, hallándose sólo aglutinación al 5% del título homólogo del suero anti-Rachnat (valores finales, con antígenos vivos).

En cambio, con antígeno formolado, se determinó en numerosas ocasiones una intensa aglutinación, a valores del 20% aproximadamente del título homólogo, con el suero anti-Djasinan, único en su suerogrupo en la clasificación en vigor.

Realizada la correspondiente adsorción de anticuerpos, se obtuvo el siguiente resultado :

Suero	Adsorbido por cepa	Frente a cepa	-d i l u c i o n e s-			
			1:10	1:50	1:100	1:200
Djasiman	Salada	Salada	N	N	N	N
Djasiman	Salada	Djasiman	P	P	P	P

Cuando se pudieron realizar las pruebas de microaglutinación con antígenos vivos, se pudo comprobar que los porcentajes de los títulos homólogos eran entonces mucho menores, como se deduce de los cuadros correspondientes. -

CONCLUSIONES

1.) Mediante siembra directa de las muestras en medio de Savino y Rennella o aún de Korthof adicionado con 4% de sulfanilamida, se ha producido el rápido desarrollo de contaminación y en ningún caso el de leptospiros, por lo que se estima necesaria una purificación previa.

2.) La aplicación para tal fin de las bujías Pasteur-Chamberland L3, discos Seitz EKs o la "filtración rápida por cobayo" no ha resultado satisfactoria, debido a la elevada retención de leptospiros que se produce.

3.) Las membranas Millipore HA permitieron obtener leptospiros, aunque generalmente bastante contaminadas. Con las de tipo PH se obtuvieron cultivos poco contaminados o puros, y con las GS, mayor número de estos últimos, si bien estas membranas tienen una tendencia mayor a la retención de leptospiros.

De este modo se ha logrado una técnica de aislamiento sencilla, que además ha dado resultados positivos más rápidamente y en mayor número de casos que el medio de Zuelzer para leptospiros saprófitas, no hallándose por otra parte restringida a éstas últimas.

4.) Se ha observado además que la membrana GS es la más conveniente para la purificación de cultivos contaminados, lo que constituye una aplicación práctica importante.

5.) Mediante sulfanilamida, pudieron eliminarse selectivamente en casi todos los casos ciertas espiroquetas, filtrables aún por GS, que se hallaban contaminando algunas de las cepas obtenidas, lo que complementa la técnica de aislamiento mencionada.

6.) Las leptospiros parecen ser totalmente retenidas por las membranas VC y VM, por lo que no resultan adecuadas.

7.) Se ha demostrado que con frecuencia las cepas obtenidas de distintas porciones de un mismo filtrado eran antigénicamente distintas. Esta frecuencia es mayor si se consideran distintas también aquellas cepas que exhiben diferencias de aglutinabilidad, fe-

nómeno estudiado ya en leptospiras patógenas por algunos investigadores, pero cuya explicación aún permanece oscura. (202, 203)

Estos aislamientos de cepas distintas revelan la frecuente coexistencia de variados tipos antigénicos en una misma agua.

8.) Por otra parte, se han hallado cepas relacionadas suerológicamente con otras de diversos orígenes, probándose una vez más que antígenos que componen el mosaico de las *L. acuicolas* pueden hallarse en cepas de proveniencia incluso muy lejana.

SUGERENCIAS

Sugerimos que el método de aislamiento mediante membranas, sea ensayado para la obtención de leptospiras de orina por cultivo, y de otros materiales contaminados adaptándolo a las necesidades de cada caso.

También creemos conveniente la prosecución del estudio antigénico de algunas cepas examinadas en este trabajo, teniendo presente los resultados de ciertos autores. (204)

Luego será interesante ensayar para el suerodiagnóstico preliminar de la leptospirosis en diversas especies animales, aquellas cepas que hemos encontrado vinculadas a la semaranga RS 173, Patoc 1 y Sao Paulo.-

Rothschild *acutus*

Juliano *pacas*

APENDICE

NUEVA PROPUESTA DE CLASIFICACION

Cuadro N° 43

SUBCOMITE DE TAXONOMIA DE LEPTOSPIRA DEL COMITE INTERNA-
CIONAL DE NOMENCLATURA BACTERIOLOGICALISTA DE SUEROTIPOS Y SUB-SUEROTIPOS DE LEPTOSPIRAS PARASITAS

<u>Grupo</u>	<u>Suerotipo</u>	<u>Sub-Suerotipo</u>	<u>Cepa Tipo</u> (x)
icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	incompleta (xxx)	HGA
	icterohaemorrhagiae	icterohaemorrhagiae	M20
	icterohaemorrhagiae	mankarso	Mankarso
	(xx) icterohaemorrhagiae	ndahambukuje	Ndahambukuje
	naam	naam	Naam
	(xx) naam	mwogolo	Mwogolo
	naam	dakota	Grand River
	sarmin		Sarmini
	birkini	birkini	Birkin
	birkini	smithii	Smith
ndambari		Ndambari	
-----	-----	-----	-----
javanica	javanica		Veldrat Ba- tavia 46
	poi		Poi
	coxus		Cox
	sofia		874
	celledoni	celledoni	Celledoni
	celledoni	whitcombi	Whitcomb
-----	-----	-----	-----
canicola	canicola		Hond Utrecht
	schueffneri		Vleermis 90C
	benjamin		Benjamin
	Jonsis		Jones
	sumneri		Sumner
	malaya		H6
	(xx) kamitunga		Kamitunga
	(xx) bafani		Bafani
	(xx) kahendo		Kahendo
	broomi		Patane
bindjei		Bindjei	
-----	-----	-----	-----
ballum	ballum	ballumensis	Mus 127
	ballum	castellonis	Castellon 3
-----	-----	-----	-----
pyrogenes	pyrogenes		Salinem
	zanoni		Zanoni
	abramis		Abraham
	biggis		Biggs
	hamptoni		Hampton
	alexii		HS616
	robinsoni		Robinson
	(xx) manilae		LT398
-----	-----	-----	-----
cynopteri	cynopteri		3522C
	butembo		Butembo
-----	-----	-----	-----

<u>Grupo</u>	<u>Suerotipo</u>	<u>Sub-Suerotipo</u>	<u>Cepa Tipo</u>
autumnalis	autumnalis	autumnalis	Akiyami A
	autumnalis	rachmati	Rachmat
	autumnalis	fort-bragg	Fort-Bragg
	autumnalis	bulgarica	Nikolaevo
	bangkinang		Bangkinang 1
	erinaceti-auriti		Erinaceti-auriti
	mooris		Moores
	sentot		Sentot
	djasiman	djasiman	Djasiman
	djasiman	gurungi	Gurungi
pomona	pomona	pomona	Pomona
	pomona	cornelli	CB
australis	australis		Ballico
	muenchen		Muenchen C 90
	bratislava		Jez Bratislava
	fugis		Fudge
grippotyphosa	grippotyphosa		Moskva V
hebdomadis	hebdomadis	hebdomadis	Hebdomadis
	hebdomadis	nona	Nona
	(xx) kambale		Kambale
	kremastos		Kremastos
	worsfoldi		Worsfold
	(xx) jules		Jules
	borincana		HS - 622
	(xx) kabura		Kabura
	mini	mini	Sari
	mini	swajizak	Swajizak
	mini	georgia	LT 117
	hardjo		Hardjoprajitno
	wolffii		3705
	medanensis		Hond HC
	sejroe	sejroe	M 84
	sejroe	balcanica	1627 Burgas
	saxkoebing	saxkoebing	Mus 24
	saxkoebing	nero	Nero
	haemoliticus	haemoliticus	Marsh
	haemoliticus	ricardi	Richardson
bataviae	bataviae		Swart
	paidjan		Paidjan
	djatzi		HS 26
hyos	hyos	hyos	Mitis Johnson
	hyos	bakeri	LT 79
	hyos	guidae	RP 29
	atlantae		LT 81
	kisuba		Kisuba

LISTA DE SUEROTIPOS DE LEPTOSPIRA BIFLEXA

semaranga	semaranga	Veldrat S173
	patoc	Patoc 1
	sao - paulo	Sao - Paulo

- (x) La primera cepa tipo indicada en cada suerotipo es considerada como cepa tipo de ese suerotipo.
- (xx) Clasificación provisional, dependiente de trabajos ulteriores.
- (xxx) El suerotipo incompleta se coloca antes del icterohaemorrhagiae debido al descubrimiento anterior de su cepa tipo (RGA).

BIBLIOGRAFIA

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7^o ed. William & Wilkins - Baltimore, (1957)
2. Austoni, M. Le leptospirosi. 2^a ed. Minerva médica, Turin (1953)
3. Babudieri, B. Rend. Ist. Sup. Sanità. 17, 986, (1954).
4. Wenyon, C.M. Protozoology. Ballière, Tindall & Cox. (1926)
5. van Thiel, P.H. Antoine van Leeuwenhoek, 25, 161 (1959)
6. Alston, J.M. y Broom, J.C. Leptospirosis in man and animals. E. & S. Livingstone, Edimburgo y Londres, (1958)
7. Prévot, A.R. Mamel de classification et de détermination des bactéries anaérobies; 2^a ed. Masson, París, (1948)
8. Wilson & Miles. Topley & Wilson's principles of bacteriology and immunity. 3^a ed. E. Arnold (1948)
9. Inada, R. y Ido, Y. Tokyo Ijishinshi Nº 1908 (1915) Citado por (27)
10. Inada, R. y Ido, Y. Tokyo Ijishinshi Nº 1926 (1915). Citado por (27)
11. Inada, R. y Ido, Y. Tokyo Ijishinshi Nº 1964 (1916) Citado por (27)
12. Inada, R., Ido, Y., Hoki, R., Kaneko, R. y Ito, H. J. exp. Med. 23, 377 (1916)
13. Uhlenhuth, P. y Fromme, W. Med. Klinik. 11, 1202, (1915)
14. Uhlenhuth, P. y Fromme, W. Berl. klin. Wschr. 53, 269, (1916)
15. Uhlenhuth, P. y Fromme, W. Z. Immunforsch. 25, 317, (1916)
16. Hübener, E.A. y Reiter, H. Dtsch. med. Wschr., 41, 1275, (1915)
17. Hübener, E.A. y Reiter, H. Dtsch. med. Wschr., 42, 131, (1916)
18. Wolbach, S.B. y Binger, C.A.L. J. med. Res., 30, 23, (1914)
19. Uhlenhuth, P. y Zuelzer, M. Zbl. f. Bakt. 84, 141, (1920)
20. Noguchi, H. J. Exp. Med. 25, 755, (1917)
21. Miller, N.G. y Wilson, R.B. J. Bacteriol. 84, 569, (1962)
22. Simpon C.F. y White, F.H. J. Infect. Dis. 109, 243, (1961)
23. Babudieri, B. y Castelli, M. Rend. Ist. Sup. Sanità. 21, 698, (1958)
24. Ido, Y., Ito, H. y Wani, H. J. exp. Med., 28, 435, (1918)
25. Koshina, M., Shiozawa, S. y Kitayama, K. J. exp. Med. 42, 873 (1925)
26. Baermann, G. y Zuelzer, M. Klin. Wschr., 6, 979, (1927)
27. Wolff, J.W. y Broom, J.C. Docum. Med. geogr. trop., 6, 77, (1954)
28. Savino, E. y Rennella, E. Rev. Inst. Bact. Malbrán, 14, 109, (1949)
29. Savino, E. y Rennella, E. Rev. Inst. Bact. Malbrán, 14, 270, (1949)

30. O.M.S. Ser. Inf. Téch. N^o 169 (1958). Ginebra, 1959 (Comité mixto OMS/FAO de expertos en Zoonosis. 2^a informe.)
31. Bahudieri, B. Conferencia pronunciada el 20/IX/1963.
32. Cachtgens, W. Z. Immunforsch., 107, 96, (1950).
33. York, C.J. Amer. J. Vet. Res., 13, 117, (1952)
34. Ezell, S.B., Hoag, W.G., Warner, A.R., Yager, R.H. y Gochemur, W. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 60, 220, (1952)
35. Dacres, W. Amer. J. Vet. Res., 22, 570, (1961)
36. OMS. Diagnosis and typing in leptospiroses. Report of a Study Group. Technical report series N^o 113 (1956)
37. Borg - Petersen. Congr. int. Méd. trop., 3, Amsterdam, Acta, 1, 395, (1938), citado por (6)
38. Gispen, R. y Schiffner, Zbl. f. Bakt. I 144, 427, (1939)
39. van Riel, J. Ann. Soc. belge Méd. Trop., 26, 197, (1946)
40. Alexander, A.D., Wetmore, P.W., Evans, L.W., Jeffries, H. y Gleiser, C.A. Amer. J. trop. Med. Hyg., 4, 492, (1955)
41. Bahudieri, B. Rend. Ist. Sup. Sanità. 18, 57, (1955)
42. Bahudieri, B. Z. Hyg. Infektkr., 143, 121, (1956)
43. Bahudieri, B. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 12, 93, (1952)
44. Wolff, J.W. The laboratory diagnosis of Leptospirosis. Springfield, Illinois. Thomas (1954)
45. Bahudieri, B. Bull. O.M.S., 24, 45, (1961)
46. Cacchione, R.A. Rev. Invest. Ganaderas. N^o 14, 105, (1962)
47. Wolff, J.W. Serological classification of type Strains of Leptospirae. Advances in the control of Zoonoses. Viena, WHO monograph, series N^o 19, 139, (1953)
48. Dymowska, Z. y Bahudieri, B. Rend. Ist. Sup. Sanità. 25, 443 (1962)
49. Addamiano, L. Rend. Ist. Sup. Sanità. 20, 482, (1957)
50. Walch-Sorgdrager, B. Bull. Health Org. League Nat., 8, 143 (1939)
51. Yamamoto, S. Jap. J. Med. Progress, 41, N^o 10 (Oct. 1954), p. 468. citado por (49)
52. Schiffner, W. y Mochtar, A. Zbl. f. Bakt. I 101, 405, (1927)
53. Bessemans, A., Wicbolle, P. y Niemigeers, L. Bull. Acad. Roy. Méd. Belg., 8, 442, (1943)
54. Bessemans, A. y Deron, R. Bull. Acad. Roy. Méd. Belg., 12, 236 (1947)
55. Pike, R.M. y Schultze, M.L. J. Immunol., 81, 172, (1958)
56. Parnas, J., Malinowski, R. y Halgas, A. Zbl. f. Bakt. I., 183, 101, (1961)
57. Hiatt, C.W. "Biochemical studies on the leptospiroses". Symposium on the leptospiroses. Medical Science publication N^o 1, 154 (1953).

58. Schneider, M.O.. Proc.Soc.exp.Biol.Med., 82, 655, (1953)
59. Rothstein, N. y Hiatt, C.W. J. Immunol. 77, 257, (1956)
60. Rothstein, N. J. Immunol., 79, 276, (1957)
61. Papachiriacu, E. Rend.Ist.Sup.Sanità, 23, 494, (1960)
62. Rothstein, N. y Wollman, F. J. Infect.Dis., 105, 280, (1959)
63. Schneider, M.D. Proc.Soc.exp. Biol.Med., 85, 32, (1954)
64. Schneider, M.D., J. Infect. Dis., 94, 297, (1954)
65. Schneider, M.D. Amer.J.vet.Res., 16, 173, (1955)
66. Schneider, M.D., Exp.Parasit., 4, 107, (1955)
67. Schneider, M.D. y McLaughlin, J., J.Bacteriol. 70, 87, (1955)
68. Heymann, G. y Siefert, G. Z. Immunforsch., 116, 257 (1958),
citado por (100).
69. van Riel, J., Van Sande, Marc y van Riel, M., C.R. Acad.Sci.
(Paris) 250, 3235 (1960).
70. Pande, P.G., Sekariah, P.G. y Shukla, R.R. Nature, 189, 511 (1961)
71. Fizi, M. y Csóka, R. Zbl. f.Bakt. I., 182, 494, (1961)
72. Cacchione, R.A., Cascelli, E S., Bulgini, M.J. y Martínez, E.S.
Rev. Invest. Ganaderas, Nº 14, 143, (1962)
73. Koulumies, R. y Salminen, A. Ann. Med. intern. Fenn. 42,
supl. 16, (1953) - citado por (6).
74. Comunicación leída en el VII Congr. Intern. de Med. Trop.
y Malaria, Río de Janeiro, Sept. 1963.
75. Taylor, J. y Goyle, A.N. Indian Med. Research Mem. Nº 20 (1931)
citado por (6).
76. Sardjito, M. y Mochtar, A. Geneesk.Tijdschr.Ned.Ind. 79, 2520,
(1939). Citado por (6).
77. Dymowska, Z. Med. dosw. Mikrobiol., 12, 71, (1960)
78. Babudieri, B. y Dymowska, Z. Zbl. f. Bakt.I., 182, 129 (1961)
79. Tierskij, V.I. Zb.Mikrobiol. Epidemiol.Immunobiol., Nº 9,
48, (1960).
80. Czekalowski, J.W. y Horne, G.O. Brit. med. J., II, 879, (1951)
81. Czekalowski, J.W. y McLeod, J.W. - J.Path.Bact., 67, 43 (1954)
82. Fizi, M. y Csóka, R. Zbl. f. Bakt. I., 178, 222, (1960)
83. Fizi, M. y Csóka, R. J. Bacteriol., 80, 569, (1960)
84. Reiter, H. y Ramme Dtsch. med. Wschr., 42, 1282 (1916)
85. Uhlenhuth, P. Dtsch. med. Wschr., 43, 1553, (1917)
86. Vervoort, H. Geneesk. Tijdaschr. Ned. Ind., 62, 697, (1922)
y 63, 800, (1923). Citado por (44).
87. Czekalowski, J.W., McLeod, J.W. y Rodican, J. J.Gen.Microbiol.,
10, 199, (1954).

88. Czekalowski, J.W., McLeod, J.W. y Rodican, J. Brit.J.exp.Path. 34, 588, (1953)
89. Stuart, R.D. J. Path. Bact., 58, 343, (1946)
90. Chang, S.L. J.Infect.Dis., 81, 28, (1947)
91. Savino, E. y Rennella, E. Leptospira y Leptospirosis en la Republica Argentina. Tomás Palumbo (1944)
92. Woratz, H. Z.Hyg.Infektr., 134, 78, (1952) Cit. por (93) y (100)
93. Cox, C.D. y Larson, A.D. J Bacteriol. 73, 587, (1957)
94. Armstrong, J.C. y Goldberg, H.S. Amer. J. vet. Res., 21, 311, (1960)
95. Stalheim, O.H.V. y Wilson, J.B. J.Bacteriol, 86, 482, (1963)
96. Kirschner, L. y Graham, I. Brit. J. exp. Path., 40(1), 57 (1959)
97. Aktan, M. y Ertuğrul, S. Türk.Ij.tacr.Biyol.Derg., 20, 260 (1960)
98. Yanagawa, R., Hiramune, T. y Fujita, J. J.Bacteriol., 85, 875 (1963)
99. Damon, S.R. y Hamill, B. J.Bacteriol., 18, 345, (1929)
100. Kolochine Erber, B. y Mailloux, M. Physiologie et métabolisme des leptospire, Masson, Paris (1962)
101. Ellinghausen, H.C. J.Infect.Dis. 106, 237 (1960); Amer.J.vet. Res., 20, 1072, (1959)
102. Gordon Smith, C.E. y Turner, L.H. Bull. OMS, 24, 35, (1961)
103. Noguchi, H. J.exp. Med., 27, 593, (1918)
104. Dinger, J.E. Geneesk. Tijdschr. Ned.-Ind., 72, 1440 (1932), citado por (100)
105. Chang, S.L., J.Infect.Dis., 81, 35. (1947).
106. Marshall, P.B. J.Infect.Dis. 84, 150 (1949)
107. Fulton, J.D. y Spooner, D.F. Exp.Parasit., 5, 154 (1956)
108. Larson, A.D. y Edwards, C.L. Bact.Proc., 54 (1958)
109. Supniewski, J.V. y Hano, J. Bull. Int. Acad. Polon.Sci. et Lettres Cl. Méd., 499 (1938). Citado por (100)
110. Rosenfeld, D.W. y Meridian, R.G. J. Bacteriol., 42, 165 (1941)
111. Greene, M.R., Camien, M.N. y M.S. Dunn. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 75, 208, (1950)
112. Gerhardt, M.R. y Ball, M.G. J. Bacteriol., 77, 17 (1959)
113. Johnson, R.C. y Wilson, J.B. J. Bacteriol, 80, 406 (1960)
114. Johnson, R.C. y Gary, N.D. J. Bacteriol., 83, 668, (1962)
115. Markovetz, A.J. y Larson, A.D. Proc. Soc. exp. Biol. Med. 101, 638, (1959)
116. Helprin, J.J. y Hiatt, C.W. J.Infect.Dis., 100, 136, (1957)

117. Woratz, H. Zbl. f. Bakt. II. 169, 269 (1957) citado por (127)
118. Ivler, D., Bact. Proc., 164 (1960) Citado por (127)
119. Kemenes, F. y Lovrekovich, L., Acta vet. Acad. Sci. Hung. 9, 235 (1957)
120. Parnas, J., Košlak, A. y Krukowska, M. Zbl. f. Bakt. I. 180, 386 (1960)
121. Bertok, I. y Kemenes, F. Acta microbiol. Acad. Sci. Hung., 7, 251 (1960)
122. Kmetz, E. y Bakoss, P. Zbl. f. Bakt. I. 181, 503, (1961)
123. Mifuchi, I. y Kawata, T. Medicine and Biology (Japón), 28, 128, (1953). Citado por (100).
124. Mifuchi, I., Hosoi, M. y Yanagihara, Y. Jap. J. Microbiol., 5, 215, (1961)
125. Vaneseltine, W.P. y Staples, S.A. J. Infect. Dis., 108, 262, (1961)
126. Parnas, J., Krukowska, M. y Nowac, K. Zbl. f. Bakt. I., 186, 369, (1962).
127. Vogel, H. y Hutner, S.H. J Gen. Microbiol., 26, 223, (1961)
128. Faine, S. - Proc. Univ. Otago Med. Sch., 36, 27, (1958)
129. Faine, S. J. Gen. Microbiol., 20, 246. (1959)
130. Faine, S. J Gen. Microbiol., 22, 1, (1960)
131. Stevtler, J.G. S. Afr. Med. J., 36, 413, (1962)
132. Ezhova, N.G., Zh. mikrobiol. epidemiol. immunobiol. N° 3, p. 79 (1960)
133. Babudieri, B. y Zardi, O. Atti del IX Congresso Nazionale di Microbiologia, Palermo (Italia). 5-7 Abril de 1956.
134. Babudieri, B. y Zardi, O. Rend. Ist. Sup. Sanità, 22, 244 (1959)
135. Babudieri, B. y Zardi, O. Z. f. Vit.-Horm.-u. Fermentforschung. 11, N° 4, 299, (1960-61)
136. Ashmarin, I.I. Zh. mikrobiol. epidemiol. immunobiol. N° 11, p. 85 (1960)
137. Chang, S.L., Buckingham, M. y Taylor, M. J. Infect. Dis., 82, 256, (1948).
138. Babudieri, B. e Archetti, I. Rend. Ist. Sup. Sanità, 10, 962 (1947)
139. Annear, D.I., J Path. Bact., 72, 322, (1956)
140. Annear, D.I. Aust. J. exp. Biol. med. Sci., 36, 1, (1958)
141. Annear, D.I. J Gen. Microbiol., 27, 341 (1962)
142. Otsuka, S. y Manako, K. Jap. J. Microbiol. 5, 141, (1961)
143. Babudieri, B. Rend. Ist. Sup. Sanità, 11, 1046 (1948)
144. Leiguarda, R. Rev. Obras Sanitarias de la Nación, 31, N° 147, 88, (1952)
145. Füzi, M. y Csóka, R. Zbl. f. Bakt. I., 179, 231, (1960).
146. Füzi, M. y Csóka, R. J. Bacteriol., 81, 1008, (1961).

147. Hindle, E. Brit.Med.J., 2, 57 (1925), cit. por (2)(6)(1) y (100)
148. Mailloux, M. v Kolochine Erber, B. Ann.Inst.Pasteur, 100, 390 (1961)
149. Füzi, M. v Csóka, R. J. Path.Bact. 82, 208, (1961)
150. Pentek-Juhász, M. Acta vet. Acad.Sci.Hung., 10, 233 (1960)
151. Adamski, J. Zbl. f. Bakt. I. 112, 476 (1929), cit. por (135)
152. von Vagedes, K. Zbl. f. Bakt. I. 133, 401 (1935)
153. Kitaoka, M. Zbl. f. Bakt. I., 138, 178 (1937)
154. Kiktenko, B. v Mielnikova, A. Zh.mikrobiol., epidemiol., immunobiol. 9, 69, (1947) citado por (135)
155. Alexander, A.D., Stoenner, H.G., Wood, G.E. v Byrne, R.J. J. Bacteriol., 83, 754, (1962)
156. Schiffner, W. Zbl. f. Bakt. I. 145, 341, (1940)
157. Appelman, J.M. Leenwenhoek ned. Tijdschr., 1, 22, (1934). Citado por (2) y (6).
158. van Thiel, P.H. The Leptospiroses. Universitaire Press. (Leiden) (1948) - citado por (2) y (6).
159. Mochtar, A. Thèse. (Amsterdam) (1927) citado por (138).
160. Uhlenhuth, P. v Zuelzer, M. Zbl. f. Bakt. I, 85, 1, 141 (1920) citado por (138)
161. Hirsch, K. Z.f. Immunforsch., 71, 459 (1931). Citado por (138)
162. Suginoto, H. Jap.J.exp.Med., 16, 143 (1938). Citado por (138)
163. Kitaoka, M. Zbl. f. Bakt. I, 122, 314 (1931)
164. Babudieri, B. Comunicación personal.
165. Tiérskij, V.I. Leptospirozy - Medgiz, Moscú (1952) cit. por (172)
166. Stavitsky, A.B. J. Infect. Dis. 76, 179 (1945)
167. Cousineau, J.G. v McKiel, J.A. Can.J.Microbiol., 7, 751, (1961)
168. Menges, R.W., Rosenquist, B.D. v Galton, M.M. J. Amer.vet. Med. Ass., 137, 313, (1960)
169. Galton, M.M., Menges, R.W. v Shotts, E.B. "Leptospirosis- Methods in laboratory diagnosis" (1960) U.S. Dept.Hlth. Communicable Diseases Center, Atlanta, EE.UU.
170. Pokorný, B., Jirovec, O. v Havlik, O. Čs.biologie (Checoslov.) 1, 21, (1952) Citado por (172)
171. Ehrlich, R. Advances in Appl. Microbiol. 2, 95, (1960)
172. Pokorný J. v Havlik, O. Čsl. epid., mikrobiol., imunol., 6, 204, (1957) (Checoslovaquia)
173. Daubner, I. Biología, 12, 203, (1957) (Checoslovaquia)
174. Kmetv, E. Comunicación personal.
175. Rittenberg, M.R., Linscott, W.D. y Ball, M.G. J.Bacteriol. 76, 669, (1958).
176. van Riel, J. Brux.Méd., 28, 2054 (1948). Citado por (6)

177. Okazaki, W. y Ringen, M.L., Amer.J. vet. Res., 18, 219, (1952)
178. Zuelzer, M., Zbl. f. Bakt. I. 105, 384 (1928)
179. Polanen, Th. O. E., Rev. Belge Sci. Méd., 13, 71 (1941)
180. Ruys, A. C., Cit. en (6), (100); y Leenwenhoek ned. Tijdschr., 11, 168, (1946)
181. Addamiano, L., Rend. Ist. Sup. Sanità, 22, 1009, (1959)
182. Zuelzer, M., Zbl. f. Bakt. II. 94, 218, (1936)
183. Babudieri, B., Conferencia pronunciada el 17/Set./1963.
184. Corsetti, C., Ann. Ig., 4, 213, (1947)
185. van Thiel, P. H., - Ned. Tijdschr. Geneesk., 81, 6106 (1937), cit. por (6)
186. Schlinköter, H. W., Arch. Hyg. (Berlin), 134, 27, (1951)
187. Abdoelrachman, R., Antoine van Leenwenhoek, 13, 21 (1947)
188. Noguchi, H., J. exp. Med., 27, 609, (1918)
189. Alston, J. M., Lancet, 1, 806, (1935)
190. Cacchione, R. A., Cedro, V. C., Bulgini, M. J. y Martínez, E. S., Rev. Invest. Ganaderas, Nº 14, 153, (1962)
191. Loesche, W. J. y Socransky, S. S., Science, 138, Nº 3537, 139 (1962)
192. Cacchione, R. A. y col. Rev. Invest. Ganaderas. En prensa.
193. Uhlenhuth, P., Festschrift für Nocht., 636, (1937) cit. por (2, 100 y 138).
194. Bessemans, A. y Thiry, U., Rev. Belge Sci. Méd., 2, 841, (1930)
195. Bessemans, A., Wittebolle, P. y Devuyt, R., Rev. Belge Sci. Méd., 11, 275, (1939)
196. Babudieri, B. - Rend. Ist. Sup. Sanità, 10, 702, (1947)
197. Combiesco, D., Sturdza, N., Sefer, M. y Radu, I., Zbl. f. Bakt. I. 123, 103, (1958)
198. Combiesco, D., Sturdza, N., Sefer, M. y Klipper, A., Arch. roum. Path. exp. (Bucarest), 19, 201, (1960)
199. Cox, C. D. - J. Infect. Dis. 101, 203 (1957)
200. Cox, C. D., Stover, R. C. y Treick, R. W., Proc. Soc. exp. Biol. Med., 98, 265 (1958)
201. Sturdza, N., Elian, M. y Tulnan, G., Arch. roum. Path. exp. (Bucarest), 19, 571, (1960).
Sturdza, N. y Elian, M. - Arch. roum. Path. exp. (Bucarest), 20, 33, (1961)
202. Babudieri, B. y Castelli, M., Rend. Ist. Sup. Sanità, 19, 50 (1955)
203. Mailloux, M. y Kolochine Erber, B., Ann. Inst. Pasteur, 100, 247, (1961).
204. Addamiano, L. y Babudieri, B., Rend. Ist. Sup. Sanità, 18, 270, (1955).

I N D I C E

Pág.

Motivo del presente trabajo	1
-----------------------------------	---

I N T R O D U C C I O N

El Orden Spirochaetales	2
El Género Leptospira, Antecedentes	5
Morfología de las leptospiras, Estructura al microscopio electrónico	8
Nuevos suerotipos de leptospira, La taxonomía	9
Los métodos suerológicos de clasificación	14
Expresión de los resultados obtenidos en las pruebas suerológicas.....	16
Algunas consideraciones sobre la inmunquímica de las leptospiras	17
Inducción de cambios en los caracteres antigénicos	18
Breve reseña sobre la constitución química y composición de los antígenos	19
Sobre la discutida patogenicidad de ciertas Leptospirae biflexa	24
<u>Medios de cultivo, Generalidades</u>	27
Medios sólidos	29
Los medios para leptospiras saprófitas	30
<u>Nociones sobre caracteres fisiológicos y metabolismo.</u>	
El pH y la temperatura	31
Importancia del O ₂ , La respiración y factores que intervienen	31
Azúcares	32
Proteínas, aminoácidos; vitaminas	33
Lípidos, lipasas y su significado	34
Algunos factores de desarrollo	37
Efecto de agentes físicos y químicos	38
Diferencias entre leptospiras patógenas y biflexas	40
Obtención de leptospiras de aguas	43
Purificación de cultivos contaminados	45
Papel epidemiológico de las aguas	48
Aislamientos y estudios de cepas de leptospira de aguas de la República Argentina	53
Las leptospiras acuícolas y su composición antigénica	55

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

Medios empleados y su utilización	58
Animales empleados	64
Preparación de sueros hiperinmunes	64
Elementos filtrantes	65
Muestras de agua	68
Observaciones microscópicas	69
Estudio suerológico de cepas aisladas	69

P A R T E E X P E R I M E N T A L

Ensayos preliminares	73
Filtraciones por bujía L3	77
Ensayo de discos Seitz EKs	80
Primeros ensayos con membranas	80
Primeras cepas aisladas mediante membranas	81
Nuevos aislamientos y comparación entre las membranas HA, PH y GS, y otros métodos	89
Resumen de los resultados obtenidos	96

	Pág.
Algunas aplicaciones de las membranas a la purificación de cultivos contaminados	98
Ensayos con membranas VC y VM	100
Purificación mediante sulfanilamida	101
Pruebas de diferenciación de leptospiras saprófitas y patógenas	104
Estudios suerológicos	109
Resultados de los estudios suerológicos realizados	137
CONCLUSIONES	142
SUGERENCIAS	143
APENDICE. Nueva propuesta de clasificación	144
BIBLIOGRAFIA	146
INDICE	153