

# **Sobre el aislamiento de micobacterias a partir de pacientes leprosos. Particularidades bacteriológicas y el poder patógeno de las cepas cultivadas en medios artificiales\***

**Alexis Irukevich Anerik**

Doctor en Medicina Veterinaria,  
Profesor de la Facultad de Ciencias Veterinarias de La Universidad del Zulia.

## **GENERALIDADES**

Aunque todavía no ha sido posible cultivar con certeza el agente causal de la lepra humana, desde hace varias décadas aparecen publicaciones sobre bacterias acidorresistentes ocasionalmente cultivadas del material procedente de leprosos. Casi todas estas cepas resultan no patógenas para animales de experimentación; por lo menos no producen enfermedad evolutiva.

Sin embargo, el célebre investigador brasileño de Souza-Araujo presenta en 1958, al VII Congreso Internacional de Lepro-

---

\* Una parte de este trabajo fue leída por el autor ante la ilustre Academia de Medicina del Zulia en su sesión ordinaria el día 15 de enero de 1969.

logía en Tokyo, un trabajo donde llegó a demostrar que algunas cepas de bacilos acidorresistentes cultivadas a partir de lepromas, sí son capaces de producir en ratones negros y en el mono **Cebus fattuellus**, focos de estructura lepromatosa, en el sitio de inoculación.

Por otra parte, varios investigadores han tratado de transmitir la lepra a los animales de laboratorio mediante inoculación directa del material bacilífero procedente de pacientes han-senianos.

Así Adler, en 1937, escribe sobre la susceptibilidad del hamster sirio a la lepra humana. Adler modifica la resistencia del animal inoculado por medio de la esplenectomía.

Bergel, en 1957, logra reproducir nódulos bacilíferos en el sitio de inoculación en ratas blancas y ratones alimentados con dietas pro-oxidantes, dietas que inducen la susceptibilidad, según el autor mencionado.

Binford, en 1958, describe nódulos granulomatosos en las orejas de hamsters inoculados por vía intradérmica con material procedente de sólo dos enfermos lepromatosos.

Chatterjee, en el mismo año, expone sus experiencias sobre la transmisión de la lepra a los ratones negros híbridos, de supuesta susceptibilidad genética.

Shepard, en 1961, obtiene la adaptación progresiva del supuesto *My. leprae* en los tejidos blandos de la planta podal del ratón blanco, logrando pases sucesivos en dicho animal mediante inoculación de muy pequeñas dosis bacilares.

Cada uno de los autores mencionados ha afirmado que los bacilos de las lesiones de sus animales son idénticos a los de las lesiones humanas.

Las investigaciones de esta índole en Venezuela fueron iniciadas hace unos 10 años por el Dr. J. Convit, Médico Jefe de la División de Dermatología Sanitaria del M.S.A.S., Profesor Titular de Dermatología de la Universidad Central de Venezuela y actual Presidente de la Sociedad Mundial de Leprología.

En cuanto a la inoculación experimental de la lepra humana a los animales de laboratorio, Convit, Lapenta e Ilukevich lograron demostrar en hamsters (*Cricetus auratus*) que el material obtenido de lesiones borderline proporciona muchos más casos positivos para el granuloma específico experimental que el obtenido de las lesiones lepromatosas. Se considera que los bacilos comparativamente escasos de las lesiones borderline son genéticamente inestables y por lo tanto capaces de formar cepas adaptables al ambiente intracelular de otra especie (hamster).

El cultivo de las lesiones experimentales en hamsters, realizado en el medio de Löwenstein-Jensen demostró una diferencia entre las lesiones provocadas por inoculación del material borderline con las provocadas por el material lepromatoso. En las primeras casi no se pudo obtener cultivo de bacilos acidorresistentes, salvo casos excepcionales, en tanto que en las lesiones provocadas por el material lepromatoso se cultivaron micobacterias de manera sistemática. A estos bacilos los hemos clasificado en el grupo III de Runyon, como no-fotocromógenos.

### INTRODUCCION

El propósito del presente trabajo fue averiguar la frecuencia de cultivos positivos para micobacterias durante siembras sistemáticas del material leproso humano procedente de pacientes con distintos tipos y grupos de la enfermedad.

Tanto la clasificación de los enfermos como la toma de las muestras para la investigación fue supervisada por el Dr. J. Convit, y tenía lugar en las Instituciones del ramo adscritas a la División de Dermatología Sanitaria del Ministerio de Sanidad y Asistencia Social en Caracas (Dispensario Central) y Litoral (Sanatorio de Cabo Blanco).

Además, se estudiaron las particularidades bacteriológicas de los bacilos acidorresistentes cultivados en nuestros ensayos, con especial énfasis en la determinación de la virulencia y patogenicidad de cada cepa aislada, para diversos animales de laboratorio.

## ESTUDIO EXPERIMENTAL

**Material y métodos:** Se practicaron cultivos sistemáticos de especímenes procedentes de lesiones cutáneas no abiertas de pacientes hansenianos clasificados del modo siguiente:

Lepra lepromatosa (L.L.) . . . . .	122	pacientes
Lepra dimorfa o borderline (L.D.) . . . . .	92	"
Lepra tuberculoide (L.T.) . . . . .	36	"
Lepra indeterminada (L.I.) . . . . .	12	"
	<hr/>	
Total . . . . .	262	pacientes

El tejido para la investigación se retiró del paciente (biopsia) en el pabellón quirúrgico bajo estrictas condiciones asépticas, previa desinfección de la superficie de la piel en el sitio de intervención. En ninguno de los casos se tomaron muestras de lesiones abiertas.

Para los cultivos se utilizó el medio de Löwenstein - Jensen. Se usaron para cada siembra seis medios (tubos): tres de ellos con glicerina al 2 por ciento, y los otros tres sin ella. Los cultivos se observaron durante tres meses, examinándolos semanalmente. La incubación se efectuó a los 33°C - 35°C.

Las suspensiones para las siembras se prepararon del modo siguiente: se tomó un fragmento de tejido patológico del tamaño de un grano de maíz, procedente de la parte profunda del espécimen, y se trituró en un mortero con un poco de solución salina isotónica estéril. Luego se trató la suspensión del tejido (con fines de homogeneización y eliminación de la posible flora asociada) con una solución de NaOH al 1 por ciento, agitándola durante 10 minutos, centrifugándola (durante 6 minutos a 2000 r.p.m.) y neutralizando el sedimento obtenido con HCl 1/N. Al suspender de nuevo el sedimento en varias gotas de la solución de Hanks, se sembraron dos gotas de esta suspensión para cada tubo.

Todos los cultivos primarios obtenidos en nuestras experiencias fueron llevados en pases sucesivos (repiques o subcul-

tivos) en distintos medios de cultivo, y su desarrollo fue estudiado a diversas temperaturas de incubación: a los 30, 35 y 40°C.

Para los repiques se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

1. Löwenstein - Jensen con glicerina (al 0,75 y 2 por ciento)
2. Löwenstein - Jensen sin glicerina.
3. Agar nutritivo (Bacto Nutrient Agar, Difco).
4. Medio líquido según Sula (SEVAC-Praha).
5. Caldo de triptosa: Bacto Triptosa, Difco . . . . 20 gramos  
Glucosa . . . . . 2 "  
Cloruro sódico . . . . . 5 "  
Agua destilada . . . . . 1 litro  
(pH final 7.0)
6. Medio líquido compuesto:  $K_2HPO_4$  . . . . . 1,8 gramos  
 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  . . . . . 0,5 "  
Citrato de sodio . . . . . 0,9 "  
 $Fe_2(SO_4)_3 \cdot 9H_2O$  . . . . . 0,2 "  
Glucosa . . . . . 10,0 "  
Glicerina . . . . . 100 mililitros  
Ext. de carne de Buey  
(Beef Extract B.B.L.) . . . . 4,5 gramos  
Peptona  
(Gelysate B.B.L.) . . . . . 10,0 "  
Agua destilada . . . . . 1000 mililitros  
(pH final 7.0)

Para la siembra en los pases sucesivos se utilizaron suspensiones bacilares de  $50 \times 10^7$  de micobacterias por c.c. de suero fisiológico. En cada uno de los medios designados para el repique se sembró una gota de la suspensión bacilar mencionada.

El recuento bacilar se practicó según la técnica descrita por Hanks.

Los cultivos obtenidos fueron sometidos a las siguientes pruebas citológicas:

1. Reacción de rojo-neutro según Middlebrook y Dubos.
2. Formación de cordones celulares (Cord Formation).
3. Prueba de la actividad catalásica según Middlebrook.
4. Prueba de niacina según Konno
5. Prueba de homogeneización bacilar según Delgado Blanco e Ilukevich.
6. Agrupación de las cepas según el esquema de Runyon.
7. Inoculación experimental en los animales de laboratorio: pollos, conejos, acures, cricetos (*Cricetus auratus* o hamster) y ratas blancas.

Para las inoculaciones de los animales de laboratorio se utilizaron suspensiones bacilares en suero fisiológico. Los conejos y pollos fueron infectados por vía intravenosa (Vena marginal de la oreja, y vena del ala respectivamente), inyectándoles cantidades de  $20 \times 10^6$  de micobacterias en 0,5 c.c. del líquido, o por vía intracutánea con  $2 \times 10^6$  de bacilos en 0,1 c.c. (pabellón de la oreja y cresta, respectivamente). Los acures recibieron por vía intraperitoneal las cantidades de  $20 \times 10^6$  de bacilos, o por vía intracutánea las dosis de  $2 \times 10^6$  de los mismos. Las ratas blancas y los hamsters fueron infectados por vía intratesticular con unos  $10 \times 10^6$  de bacilos cada uno, o por vía intracutánea en el pabellón de la oreja con 1 a  $2 \times 10^6$  de bacilos por animal.

Para las experiencias hemos utilizado animales procedentes de nuestra cría, todos clínicamente sanos y negativos a la prueba intradérmica de tuberculina (mamífera y aviaria).

En total fueron inoculados 261 animales de distinto sexo y del siguiente peso:

16 pollos de .....	550 a 1200	gramos
17 conejos de .....	980 "	1450 "
38 acures de .....	245 "	450 "
92 hamsters de .....	55 "	95 "
98 ratas blancas de ...	180 "	620 "

A los 3, 6 ó 12 meses de infección los animales fueron sacrificados, necropsiados y examinadas las lesiones. Se hizo, ade-

más, frotis por aposición del sitio de inoculación y del bazo de cada animal muerto o sacrificado, preparaciones que fueron teñidas por el método de Ziehl - Neelsen para la investigación de bacilos alcohol-ácido resistentes. Del tejido aparentemente patológico se prepararon cortes histológicos, los que fueron coloreados según Faraco - Fite y con Hematoxilina - Eosina, para su debido examen microscópico. De cada lesión pronunciada se hizo un cultivo en medio de Löwenstein - Jensen.

### RESULTADOS OBTENIDOS

Los resultados obtenidos mediante el cultivo del material lepromatoso, dimorfo, indeterminado y tuberculoide son resumidos en el cuadro N° 1.

Cuadro N° 1: Micobacterias cultivadas a partir de material leproso.

Lepra	Número de pacientes examinados	Pacientes con cultivo positivo	%
lepromatosa	122	19	15,5
dimorfa	92	1	1,1
indeterminada	12	0	0
tuberculoide	36	1	2,8

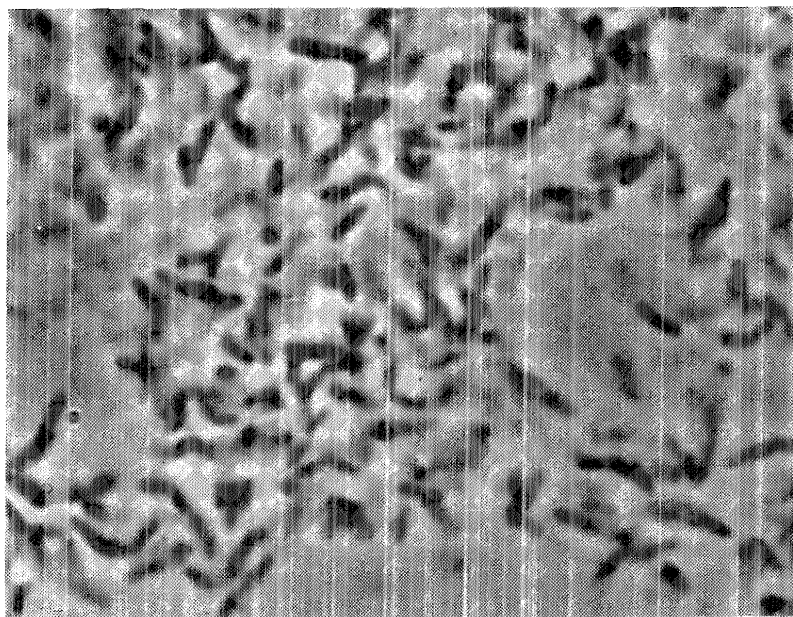
El cuadro N° 1 demuestra que de los 122 pacientes del grupo de la lepra lepromatosa, 19 proporcionaron cultivos positivos para micobacterias (15,5 por ciento) y que, por otra parte, de los 140 enfermos correspondientes a los tres grupos restantes se lograron aislar micobacterias solamente en dos casos (Cepa "315-ASL" del material tuberculoide, y Cepa "914-NA" del material borderline).

**Morfología:** Los preparados microscópicos de las cepas aisladas (frotis teñidos por el método de Ziehl-Neelsen) revelaron bacilos rectos o ligeramente incurvados, con extremos redondeados y con el protoplasma en mayor o menor grado heterogéneo.

La observación microscópica de estas células en contraste de fases (en fresco), especialmente de preparaciones procedentes de cultivos primarios, hizo notoria la existencia de abundantes formas con gránulos intracelulares, de 1 a 3 en cada célula y cuyo diámetro no raras veces superaba el ancho del bacilo (Fotos Nº 1 y 2).

Sin embargo, las células de la cepa "96-JC" (escotocromógenas) se presentaron en forma de cocos alcohol-ácido-resistentes, tanto en el cultivo primario, como en los repiques posteriores.

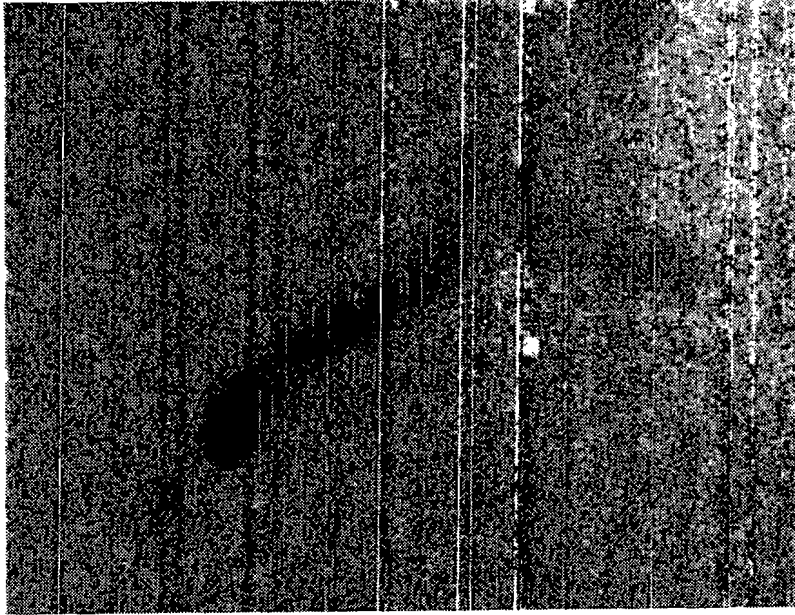
Las dimensiones bacilares oscilaron entre las 0,6 y 7,3 micras de longitud, con un promedio de 2,45 para las cepas no-fotocromógenas, de 2,15 para las fotocromógenas y de 3,35 para las escotocromógenas, fluctuando su diámetro entre 0,5 y 0,6 micras, principalmente.



**Foto Nº 1: Aspecto microscópico del cultivo primario de la cepa 24-MA en el medio de Löwenstein-Jensen sin glicerina. Se observa la abundancia de bacilos con gránulos intracelulares. (Objetivo de inmersión; 1600 aumentos; proyectivo 6,3: 1; contraste de fases).**



Los valores biométricos mencionados se obtuvieron mediante apreciación microscópica de 50 células de cada cepa, procedentes de un cultivo de 6 semanas de edad en el medio de Löwenstein-Jensen sin glicerina, fijadas al calor y coloreadas según el método de Ziehl - Neelsen sobre el portaobjeto.



**Foto N° 2: Aspecto microscópico de un bacilo alcohol-ácido-resistente de la cepa 24-MA con gránulo terminal cuyo diámetro supera el ancho del bacilo. (Objetivo de inmersión; 2000 aumentos; proyectivo 6,3: 1. Coloración de Ziehl-Neelsen).**

Los bacilos procedentes de cultivos primarios en el medio de Löwenstein - Jensen se presentaron siempre como alcohol-ácido-resistentes en la coloración de Ziehl - Neelsen, no obstante, las células provenientes de los repiques en el agar nutritivo se caracterizaban por una reducida capacidad de resistir a la decoloración acostumbrada con solución alcohólica de ácido clorhídrico al 2 por ciento, durante cinco minutos.

En las preparaciones de los cultivos en medios líquidos (salvo en los de la cepa "96-JC") se observa no raras veces la exis-

tencia de formas pleomórficas alargadas y con extremos hinchados.

**Cultivo primario.** El desarrollo de las colonias en el medio de Löwenstein - Jensen generalmente fue tardío (disgónico), desde la tercera a sexta semana de incubación. Sin embargo, en los medios con glicerina se observó en cinco casos un desarrollo eugónico.

En dos casos (Cepas: 62-RC y 140-CS) los cultivos se desarrollaron en forma de colonias lisas o ligeramente granuladas, disgónicas, con elevación central y bordes irregulares, que en la obscuridad casi no formaban pigmento. Al ser expuestos estos cultivos a la luz del día (durante 1 a 4 horas) se hizo notoria, al día siguiente, la aparición de pigmento amarillo claro, que se intensificaba durante la incubación.

En otros 16 casos (Cepas: 46-JGN, 63-JGN, 96-JC, 136-EA, 151-RLT, 159-CM, 160-AE, 168-EGP, 170-DSG, 184-RV, 215-RR, 420-RR, 235-FG, 331-FV, 343-JC y 561-MCA) el crecimiento se destacó por aparición de colonias redondas, lúcidas, convexas y de color amarillo o anaranjado que se formaba en obscuridad. Estas colonias en casi todos los cultivos acusaban aspecto liso ("S") y solamente en 3 casos (Cepas: 159-CM, 184-RV y 243-JC) se registraron formas rugosas ("R").

Las 6 cepas restantes (24-MA, 137-MA, 129-GM, 315-ASL, 399-LM y 914-NA) se caracterizaban por un desarrollo relativamente lento de pequeñas colonias lisas (5 casos) o rugosas (1 caso) que a la luz continuaban incoloras o grisáceas o que adoptaban paulatinamente tonos amarillentos.

En cuanto al tamaño de las colonias, éstas muy raras veces superaban diámetros de 5 milímetros, pero con frecuencia confluían formando una capa superficial blanda y lúcida ("S") o consistente y opaca ("R").

En el siguiente cuadro Nº 2 se pueden apreciar los resultados obtenidos en diversas pruebas citológicas, practicadas con las 24 cepas de bacilos alcohol-ácido-resistentes, aisladas de 21 pacientes leprosos.

**Cuadro N° 2: Particularidades citológicas (del cultivo y bioquímicas) de las 24 cepas de bacilos alcohol-ácido resistentes, aisladas a partir del tejido leproso de 21 pacientes hansenianos.**

NN°	Cepa	Muestra	Tipo colonias	Pigmento	Desarrollo en L.-J.			Pruebas citológicas			Homoge- neización	Grupo de Runyon
					Con Glicerina	Sin Gli- cerina neutro	Rojo	Formac. cordones	Catalasa	Niacina		
1	24-MA	L.L.	S	—	—	D	+—	+—	+	—	+	III
2	137-MA	L.L.	S	—	D	D	—	+—	+	—	+	III
3	46-JGN	L.L.	S	amarillo	D	D	—	—	+	—	+	II
4	63-JGN	L.L.	S	amarillo	D	D	—	—	+	—	+	II
5	62-RC	L.L.	S	amarillo	D	—	—	—	+	—	+	I
6	96-JC	L.L.	S	anaranjado	D	D	—	—	+	—	— (!)	II
7	129-GM	L.L.	S	—	—	D	—	+—	+	—	+	III
8	136-EA	L.L.	S	anaranjado	D	D	—	—	+	—	+	II
9	140-CS	L.L.	S	amarillo	D	D	—	—	+	—	+	I
10	151-RLT	L.L.	S	amarillo	—	D	—	—	+	—	+	II
11	159-CM	L.L.	R	amarillo	E	D	—	—	+	—	+	II
12	160-AE	L.L.	S	anaranjado	D	D	—	—	+	—	+	II
13	168-EGP	L.L.	S	amarillo	—	D	—	—	+	—	+	II
14	170-DSG	L.L.	S	amarillo	D	—	—	—	+	—	+	II
15	184-RV	L.L.	SR	amarillo	E	D	—	—	+	—	+	II
16	215-RR	L.L.	S	anaranjado	—	D	—	—	+	—	+	II
17	420-RR	L.L.	S	anaranjado	D	D	—	—	+	—	+	II

18	235-FG	L.L.	S	amarillo	-	D	-	-	+	-	+	II
19	315-ASL	L.T.	S	-	D	D	-	-	+	-	+	III
20	331-FV	L.L.	S	amarillo	E	-	-	-	+	-	+	II
21	343-JG	L.L.	SR	amarillo	E	D	-	-	+	-	+	II
22	399-LM	L.L.	SR	-	E	D	-	-	+	-	+	III
23	561-MCA	L.L.	S	amarillo	-	D	-	-	+	-	+	II
24	914-NA	L.D.	S	amarillento muy tardío	D	D	-	-	+	-	+	III

Abreviaciones (Cuadro Nº 2):

- L.L. == lepra lepromatosa
- L.D. == lepra dimorfa (borderline)
- L.T. == lepra tuberculoide
- D == desarrollo disgónico de las colonias
- E == desarrollo eugónico de las colonias
- S == aspecto liso de las colonias
- R == aspecto rugoso de las colonias
- + == positivo para la prueba
- == negativo para la prueba
- + - == ligeramente positivo para la prueba.

Del cuadro Nº 2 se desprende que las cepas estudiadas por nosotros se pueden agrupar como sigue:

Grupo I de Runyon (micobacterias fotocromógenas): 2 cepas (NNº 5 y 9). Grupo II de Runyon (micobacterias escotocromógenas): 16 cepas (NNº 3, 4, 6, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21 y 23).

Grupo III de Runyon (micobacterias no-fotocromógenas): 6 cepas (NNº 1, 2, 7, 19, 22 y 24).

Grupo IV de Runyon (micobacterias de crecimiento rápido): ninguna cepa.

Nota: Las cepas NNº 1 y 2 fueron aisladas de la misma persona (M.A.) pero en distintos lapsos de tiempo; la misma aclaratoria vale para las cepas NNº 3 y 4 (paciente J.G.N.), y 16 y 17 (paciente R.R.).

El cultivo en el medio de Löwenstein-Jensen sin glicerina resultó positivo para bacilos alcohol-ácido-resistentes en 21 casos (Cepas NNº 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 23 y 24). En el medio con glicerina al 2 por ciento el desarrollo bacilar fue observado solamente en 17 oportunidades (Cepas NNº 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 20, 21, 22 y 24).

Las cepas estudiadas, con excepción de una sola (Cepa Nº 6 - "96-JC") homogeneizaron con facilidad en la prueba correspondiente. Ninguna de ellas ha fijado el rojo neutro, ni producía la niacina en cantidades apreciables. Todas las cepas acusaban marcada actividad endógena para la catalasa. Cuatro cepas pertenecientes al Grupo III de Runyon (NNº 1, 2, 7 y 24) se caracterizaban por una leve inclinación a formar cordones bacilares, particularidad de la cual carecían por completo las restantes cepas investigadas.

**Subcultivos:** Durante dos años consecutivos hemos seguido los pases sucesivos de las 24 cepas mencionadas en los medios de Löwenstein-Jensen con glicerina y sin ella, haciendo repiques cada ocho a veinte semanas.

Ya desde el primer pase la mayoría de las cepas mostraron un mejor crecimiento en los medios con glicerina. El tiempo de

su desarrollo se acortó notablemente en el transcurso de los pases y el aspecto de las cepas del Grupo III de Runyon cambió en el sentido de que las colonias grisáceas adquirieron con el tiempo una ligera pigmentación amarillenta.

Los resultados referentes al desarrollo de los subcultivos en distintos medios y a diferentes temperaturas, los expresamos en el cuadro N° 3.

El cuadro N° 3 demuestra que el crecimiento de las bacterias en cuestión depende poderosamente de la temperatura de incubación y de la clase del medio de cultivo empleado. Todas las cepas ensayadas se desarrollaron bien a las temperaturas de 30 a 35°C en los medios de Löwenstein-Jensen, líquido compuesto y Caldo de Triptosa, siendo su desarrollo en el Agar nutritivo y en líquido de Sula muy discreto, comparativamente.

Al mismo tiempo, a los 40°C no se observó proliferación apreciable en ninguno de los casos ensayados.

Como medios más aptos para nuestros subcultivos resultaron los siguientes:

1° **Líquido compuesto** (ver su composición en el capítulo sobre material y métodos).

A las tres semanas de incubación a la temperatura de 30°C todos los subcultivos correspondientes a las cepas del grupo III de Runyon (24-MA, 129-GM y 914-NA) se destacaron por la presencia de un sedimento más o menos abundante, de aspecto fino, pulverulento y de color gris claro (a veces ligeramente amarillento), que se remueve con facilidad al sacudir los tubos de ensayo. Los subcultivos de las cepas de los grupos II (63-JGN, 420-RR y 561-MCA) y I (140-CS) se caracterizan por la presencia de un velo flotante, frágil e incompleto, y por la coloración amarilla o anaranjada del sedimento.

A los 35°C el crecimiento es semejante al descrito; a los 40°C el desarrollo es casi nulo.

2° **Löwenstein-Jensen** con glicerina al 0,75 por ciento.

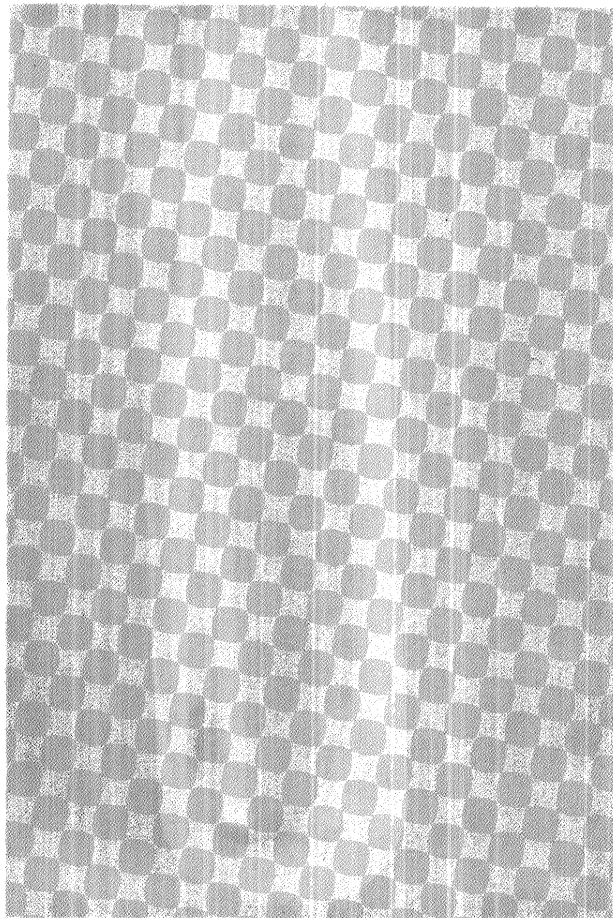
A los 30°C el desarrollo se manifiesta en forma de colonias ya descritas o en la superficie del medio de cultivo aparece una

**Cuadro N° 3: El desarrollo de las micobacterias aisladas de leproso, en distintos medios de cultivo y a diferentes temperaturas**

Cepa	Grupo de Runyon	Crecimiento a las 3 semanas de incubación														
		Löwenstein - Jensen			Sula			Caldo de Triptosa			Líquido Compuesto			Agar nitrivo		
		30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C	30°C	35°C	40°C
24-MA	III	++	+	-	+-	+-	-	++	++	-	++	++	+-	++	+	-
129-GM	III	++	+	-	+	+-	-	++	++	+-	++	++	-	+	+	-
914-NA	III	++	++	+-	+-	+-	-	+	++	-	++	++	+-	+	+	+-
63-JGN	II	+++	+++	+-	+	+	+-	++	++	+-	+++	++	+-	+	+	-
420-RR	II	++	+++	+-	+	+	+-	++	++	+-	++	+++	+-	+	++	-
561-MCA	II	++	++	+-	+	+	-	+	++	-	++	++	+-	+	+	+-
140-CS	I	++	++	-	+	+	+-	++	+	-	++	++	-	+-	+-	-

Descripción de los signos (Cuadro N° 3):

- = no hay crecimiento
- +- = vestigios del crecimiento
- + = escaso crecimiento
- ++ = buen crecimiento
- +++ = exuberante crecimiento.



**Foto N° 3: El cultivo primario de la cepa 914-NA en el medio de Löwenstein-Jensen sin glicerina a los 60 días de incubación a la temperatura de 33°C. Se nota la aparición de un pigmento amarillento, tardío y no muy pronunciado.**



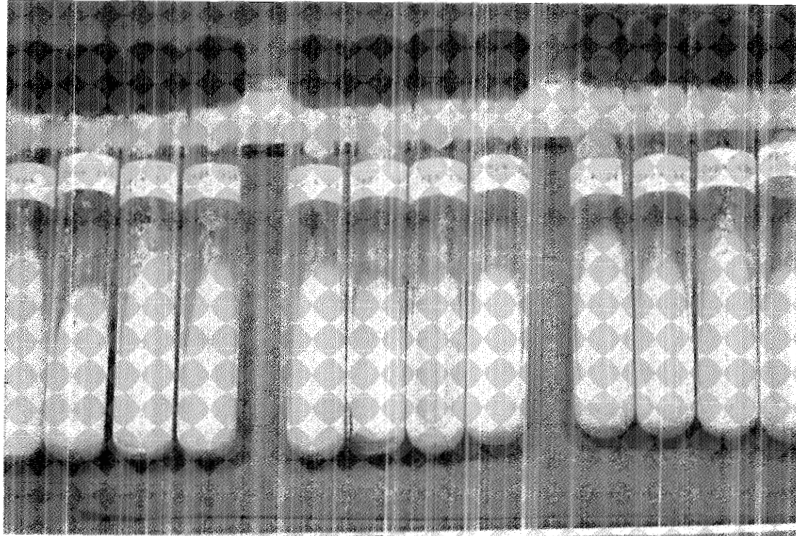


Foto N° 4: El desarrollo de los subcultivos de las cepas 24-MA, 914-NA, 420-RR, y 140-CS, en el medio de Löwenstein-Jensen a las 3 semanas y a los 30, 35 y 40°C de incubación. Se nota la ausencia del crecimiento a los 40°C.



Foto N° 3: El cultivo primario de la cepa 914-NA en el medio de Löwenstein-Jensen sin glicerina a los 60 días de incubación a la temperatura de 33°C. Se nota la aparición de un pigmento amarillento, tardío y no muy pronunciado.

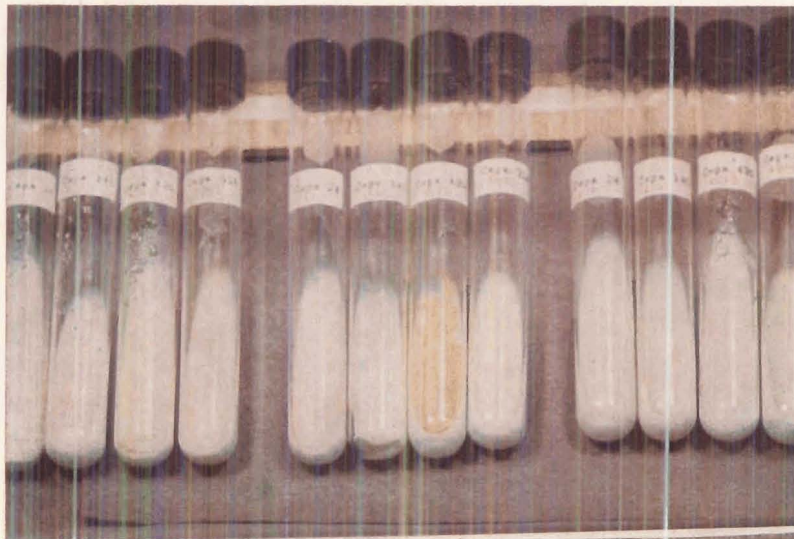


Foto N° 4: El desarrollo de los subcultivos de las cepas 24-MA, 914-NA, 420-RR, y 140-CS, en el medio de Löwenstein-Jensen a las 3 semanas y a los 30, 35 y 40°C de incubación. Se nota la ausencia del crecimiento a los 40°C.

capa de aspecto cremoso, en algunos casos muy delgada, en otros gruesa y constituida por acúmulos de masas bacilares cromógenas.

A los 35°C la proliferación bacilar es muy semejante a la descrita, sin embargo, un poco más retardada. A los 40°C el crecimiento es muy reducido y retardado o ausente.

#### **Poder patógeno.**

En el siguiente cuadro N° 4 pueden verse los resultados obtenidos en las experiencias de inoculación en diferentes especies animales.

En el cuadro N° 4 se puede observar que solamente la rata blanca y en menor grado el hamster dorado sirio resultaron susceptibles a la infección experimental; los pollos, conejos y acures se mostraron prácticamente refractarios.

Las cepas catalogadas como pertenecientes al grupo III de Runyon, con excepción de una sola (129GM) se revelaron como las de mayor poder patógeno, provocando casi en todos los casos de inoculación nódulos bacilíferos de evolución lenta y progresiva en las orejas de los hamsters, y lesiones testiculares en ratas blancas.

En el hamster la lesión inicial en la oreja (sitio de inoculación) comenzaba aparentemente entre el segundo y cuarto mes de infección, en forma de un pequeño nodulillo que se desarrollaba lentamente hasta el tamaño de un grano de maíz, o en algunos casos se diseminaba en forma difusa por toda la oreja.

Las preparaciones microscópicas (frotis por aposición coloreadas según Ziehl-Neelsen) mostraron la presencia de bacilos alcohol-ácido-resistentes, aislados o en grupos. En el corte histológico teñido con eosina-hematoxilina se observó un granuloma histiocitario, compacto, que ocupaba la mayor parte del dermo, dejando una banda sub-basal de colágeno intacta. (Ver fotos N° 3, 4, y 5).

Las lesiones más acentuadas fueron observadas en el testículo de la rata blanca. A partir del cuarto o quinto mes de la ino-

Cuadro N° 4: Poder patógeno de las 22 cepas de micobacterias cultivadas a partir de pacientes leprosos.

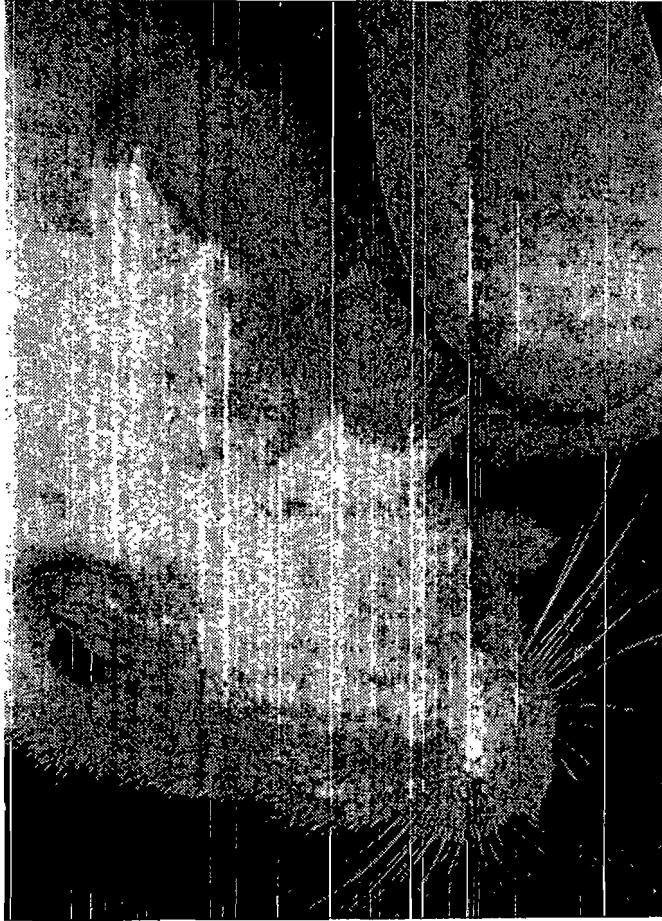
NN°	Cepa	Grupo de Runyon	Pollo		Conejo		Acure		Hamster		Rata	
			i.v.	i.d.	i.v.	i.d.	i.p.	i.d.	i.t.	i.d.	i.t.	i.d.
1	62RC	I	-	-	-	-	-	-	-	+ -	-	-
2	14OCS	I	-	-	-	-	-	-	-	+ -	-	+ -
3	46JGN	II	-	-	-	-	+ -	-	+ -	+ -	+	-
4	96JC	II			-		-	-	-	+ -	-	-
5	136EA	II							-	+ -	-	-
6	151RLT	II							-	-	+ -	-
7	159CM	II			-	-	-	-	-	-	+	+ -
8	160AE	II			-	-	-	-	-	-	-	-
9	163EGP	ii							-	-	-	-
10	170DSG	II							-	-	-	-
11	184RV	II							-	+ -	-	-
12	215RR	II							-	-	-	-
13	235FG	II							-	+ -	-	-
14	331FV	II	-	-			-		-	-	-	-
15	343JG	II	-	-	-	-	-	-	-	+ -	-	-
16	561MGA	II							-	-	-	-
17	24MA	III	-	-	-	+ -	+ -	-	+	++	++	+
18	137MA	III							+	++	++	+ -

19	129GM	III						+-	+-	+	-
20	315ASL	III			--	--		+-	++	++	+
21	399LM	III						+	+	++	+-
22	914NA	III	+(?)	-				++	++	++	+-

Descripción de los signos (Cuadro Nº 4):

- i.v. = inoculación intravenosa
- i.d. = " intradérmica
- i.p. = " intraperitoneal
- i.t. = " intratesticular
- = sin lesiones macroscópicas
- +- = lesión reversible, leve
- + = lesión progresiva, leve
- ++ = lesión progresiva, extensa

culación el testículo murino, en la mayoría de los casos, se presentaba aumentado de tamaño; al corte se observaron pequeñas cavernas llenas de masas de aspecto caseoso. En casos excepcionales el testículo mostraba una marcada reducción del tamaño normal, atrófico, y con sustancias calcificadas en su interior. Microscópicamente se observaba una gran cantidad de bacilos al-



**Foto N° 5: Aspecto del nódulo en la oreja de un hamster, a 10 meses de la inoculación intradérmica de micobacterias de la cepa 914-NA.**

cohol-ácido-resistentes, esparcidos en el tejido o situados en acúmulos parecidos a globis. En cortes histológicos se revelaba un granuloma histiocitario con vacuolización celular, con focos epiteloides esparcidos y algunas células gigantes del tipo de cuerpo extraño. En la mayor parte de las preparaciones microscópicas se destacaron extensas áreas de necrosis y formación de abscesos. (Ver fotos Nº 6, 7 y 8).

En la mayoría de los casos referidos fue posible recuperar los bacilos inoculados mediante cultivos practicados con el material tomado de la lesión experimental.

En cuanto al poder patógeno de las 16 cepas escotocromógenas (Grupo II de Runyon), la mitad de éstas resultaron no patógenas para todos los animales de la prueba; sin embargo, las 8 restantes (46HGN, 96JC, 136EA, 151RLT, 159CM, 184RV, 235FG y 343JG) causaban en ratas blancas y hamsters lesiones semejantes a las descritas, aunque de aspecto mucho menos severo y de menor extensión.

Las dos cepas fotocromógenas (Grupo I de Runyon), apenas causaron la aparición de modestos nodulillos en las orejas de los hamsters y ratas inoculadas.

### COMENTARIOS

El hecho de haber aislado bacterias alcohol-ácido-resistentes casi exclusivamente del material cutáneo de los pacientes con lepra lepromatosa, nos lleva a suponer que el tejido lepromatoso, probablemente durante el período reaccional, representa un terreno relativamente favorable para el desarrollo de micobacterias cultivables en medios artificiales.

La hipótesis de que entre los millones y millones de bacilos desarrollados en el tejido lepromatoso siempre pueden existir mutantes genéticos cultivables, podría quizás explicar los resultados obtenidos en nuestro trabajo.

Por otra parte, la transformación del *My. leprae* ya fue señalada por Imaeda y colaboradores, por cuanto los bacilos provenientes de la lepra borderline forman un contraste neto con los



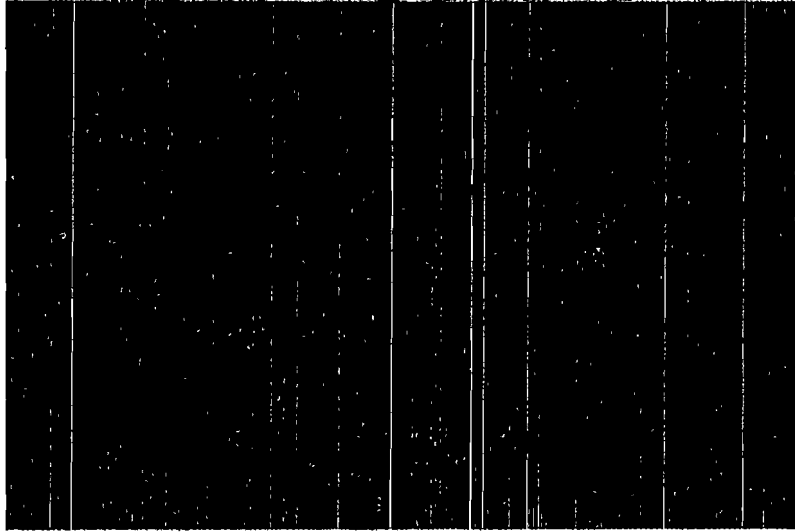
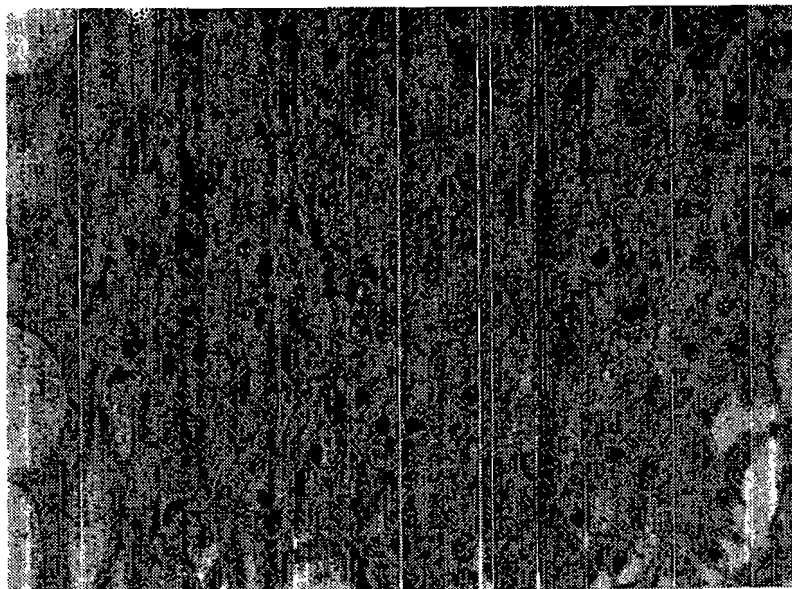


Foto N° 6: Aspecto microscópico de abundantes micobacterias en el frotis por aposición de un nódulo de la oreja de hamster, a los 7 meses de inoculación (cepa 914-NA). (Objetivo de inmersión, 1000 aumentos. Coloración de Ziehl-Neelsen).

de la lepra lepromatosa, como puede ser observado con el microscopio electrónico.

Aunque las cepas cultivadas por nosotros han permitido reunir las en diferentes grupos de Runyon, y a pesar de que solamente las del grupo III acusaban un definido y pronunciado poder patógeno para los hamsters y especialmente para las ratas blancas, todas ellas se podían reunir por una serie de particularidades bacteriológicas que poseían en común. Llamó así la atención el hecho de que, el desarrollo artificial de todas ellas se efectuaba solamente a temperaturas relativamente bajas, es decir, alrededor de los 30 a 35°C.

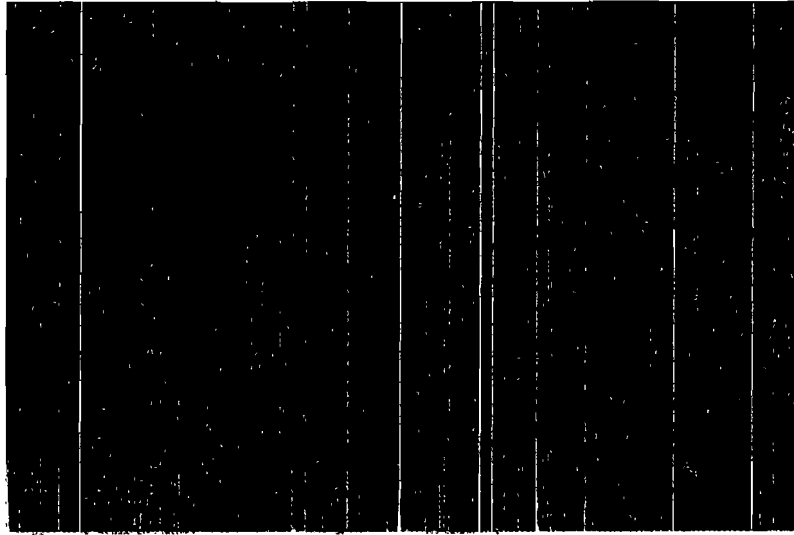


**Foto N° 7: Granuloma histiocitario en la oreja del hamster a los 8 meses de inoculación con micobacterias de la cepa 914-NA. (Hematoxilina-eosina. 400 aumentos).**

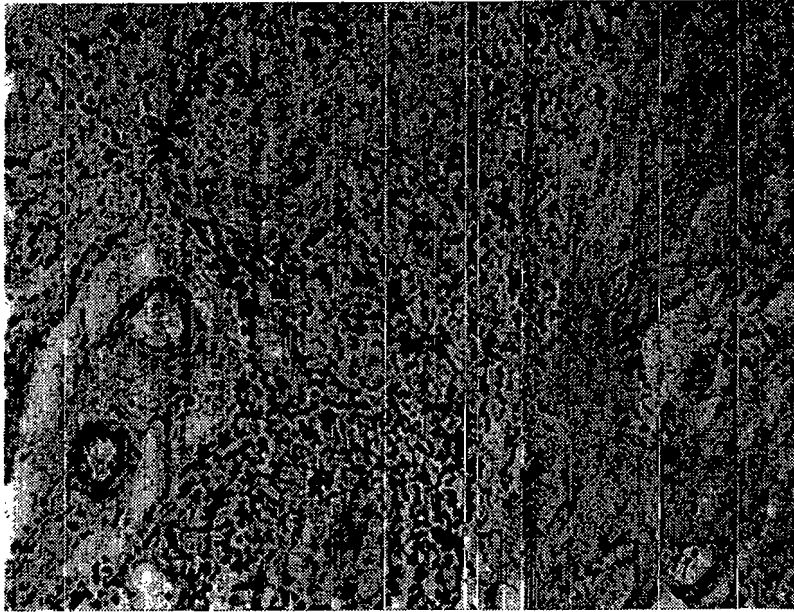
La inocuidad de nuestras cepas para los pollos excluye su pertenencia al verdadero *My. avium*; sus características del cultivo y la no patogenicidad para los conejos y acures, las diferencian del *My. bovis*, y por último, su incapacidad de producir lesiones



**Foto N° 8: Testículo murino en sección longitudinal a los 6 meses de inoculación con micobacterias de la cepa 24-MA. Se observan múltiples cavernas llenas de masas de aspecto caseoso.**



**Foto N° 9: Aspecto microscópico de micobacterias acumuladas en masas en el frotis de pus testicular murino, a los 6 meses de inoculación (cepa 24-MA). (Objetivo de inmersión, 1000 aumentos. Coloración de Ziehl-Neelsen).**



**Foto Nº 10: Focos epitelioides e infiltración linfocitaria con extensa área de necrosis en el testículo de rata blanca, a los 6 meses de inoculación con micobacterias de la Cepa 24-MA. (Hematoxilina-eosina. 160 aumentos).**

específicas en el acure, sus particularidades citoquímicas y las del cultivo, las diferencian del *My. tuberculosis*.

El crecimiento tardío de los cultivos primarios, como también su definida infecciosidad para las ratas y hamsters, especialmente de los bacilos pertenecientes al grupo III de Runyon, nos permiten separarlos de las micobacterias saprófitas.

En cuanto a la interrogante de que si las micobacterias cultivadas por nosotros personifican el verdadero agente de la lepra, aunque en alguna de sus posibles formas o fases de transformación biológica o de una mutación genética cultivable, todavía no lo podemos contestar con certeza.

Sin embargo, las observaciones descritas en el presente trabajo, nos inclinan a suponer que hemos podido aislar un microorganismo cuya acción patógena se relaciona con el proceso mor-

boso de la lepra, en virtud de la especificidad de las lesiones experimentales, y cuya identidad se revelará en futuros trabajos basados en determinación de sus particularidades antigénicas en el hombre.

### RESUMEN

Se practicó el cultivo sistemático del material procedente de lesiones leprosas no abiertas de 262 pacientes hansenianos, en el medio de Löwenstein-Jensen con glicerina al dos por ciento y sin ella, y a una temperatura de incubación de 33 a 35°C.

De los 122 pacientes del grupo lepromatoso (L.L.), 19 pacientes proporcionaron cultivos positivos para bacilos alcohol-ácido-resistentes (15,5%).

Por otra parte, de los 92 enfermos borderline (L.D.), y de los 36 tuberculoides (L.T.), se obtuvo un solo cultivo positivo en cada grupo mencionado.

Los 12 pacientes indeterminados (L.I), resultaron todos negativos para los bacilos en cuestión.

En total fueron aisladas 24 cepas correspondientes a 21 pacientes hansenianos. Dichas cepas se podían agrupar en la forma siguiente:

Grupo I de Runyon	2 cepas
Grupo II de Runyon	16 cepas
Grupo III de Runyon	6 cepas
Grupo IV de Runyon	ninguna.

Se describen las particularidades bacteriológicas de las cepas primarias y de sus repiques o subcultivos llevados durante dos años en diferentes medios de cultivo.

La temperatura óptima de su desarrollo oscilaba alrededor de 30°C, y la de inhibición no superaba unos 40°C.

El poder patógeno de estas cepas fue estudiado en pollos, conejos, acures, hamsters y ratas blancas.

Las cepas catalogadas como pertenecientes al grupo III de Runyon, con excepción de una sola, se revelaron como las de ma-

yor poder patógeno, provocando en el sitio de inoculación nódulos bacilíferos de evolución lenta, sin embargo, solamente en hamsters y ratas blancas. Las lesiones más acentuadas fueron registradas en el testículo murino donde a partir del cuarto o quinto mes de inoculación se observaban pequeñas cavernas llenas de masas de aspecto caseoso. En cortes histológicos se observaba un granuloma histiocitario con vacuolización celular, focos epitelioides esparcidos, algunas células gigantes del tipo de cuerpo extraño, y áreas de necrosis de mayor o menor extensión.

En el hamster fue notorio un granuloma histiocitario compacto, que ocupaba la mayor parte del dermo, dejando banda sub-basal de colágeno intacta.

Sólo 8 de las 16 cepas del grupo II de Runyon causaban en ratas y hamsters lesiones semejantes a las descritas, aunque de mucho menor extensión.

Las dos cepas fotocromógenas (grupo I de Runyon) apenas determinaban nodulillos en las orejas de los hamsters y ratas inoculados.

Los pollas, acures y conejos resultaron prácticamente refractarios a la inoculación mencionada.

Se supone que la acción patógena del microorganismo aislado de lesiones leprosas humanas está relacionada con el proceso morbozo de la lepra, cuya identidad se revelará en futuros trabajos basados en el estudio de sus particularidades antigénicas.

#### **SUMMARY**

A systematic culture of material obtained from closed lepromatous lesions (from 262 patients) was done in the Löwenstein-Jensen medium (without glycerine and with it at 2%) at 33°C to 35°C of incubation.

Out of 122 patients of the lepromatous group (L.L.), 19 patients yield positive cultures for alcohol-acid-resistant bacilli (15,5%).

On the other hand, out of the 92 borderline patients (D.L.), and 36 tuberculoid patients (T.L.), only one positive culture was obtained in each of the mentioned groups.

The 12 patients of the indeterminate group (I.L.) all yield negative results.

On the whole, 24 strains were isolated from 21 leprosy patients. These strains were grouped as follows:

Runyon's Group I . . .	2 strains
Runyon's Group II . . .	16 strains
Runyon's Group III . . .	6 strains
Runyon's Group IV . . .	none.

Bacteriologic peculiarities of the primary strains are described, and also of the corresponding re-cultures performed over two consecutive years in different culture media.

The optimum temperature for its growth was about 30°C. and that of the inhibition was not above 40°C.

The pathogenic strength of these strains was studied in chickens, rabbits, guinea pigs, hamsters and white rats.

The strains classified as belonging to Runyon's Group III (nonphotocromogenic), with the exception of one, showed the highest pathogenic strength, promoting at the inoculation site bacilliferous nodules of a slow and progressive evolution, only, however, in hamsters and white rats. The most accentuated lesions were found in the murine testicle, where small cavernous lesions filled with a caseous-looking material developed from the fourth to the fifth month after inoculation. Histological sections demonstrated a *histiocytic granuloma with cellular vacuolization*, scattered epithelioid foci, some giant cells of the foreign body type and areas of necrosis.

In the hamster the lesion was that of a compact histiocytic granuloma that took most of the dermis, leaving intact a sub-basal collagen band.

Only 8 out of the 16 strains of Runyon's Group II caused similar lesions to those described in rats and hamsters, although of a considerably minor extension.



The two photochromogenic strains (Runyon's Group I) only produced tiny nodules in the ears of the inoculated hamsters and rats.

The chickens, guinea-pigs and rabbits resulted practically resistant to the inoculation.

It is supposed that the pathogenic action of the microorganism isolated from the human leprosy lesions, is related to the morbid process of leprosy and its identity will be revealed in future works based on the study of its antigenic characteristics.

#### BIBLIOGRAFIA

- 1 — ADLER, S.: Inoculation of Human Leprosy into Syrian Hamsters (*Cricetus auratus*). *Lancet*, 2:714, 1937.
- 2 — BERGEL, M.: Inoculación del *Mycobacterium leprae* a ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes. 1º— Resultados bacteriológicos hasta los siete meses de la inoculación. *Semana méd.*, 111:480-489, 1957.
- 3 — BERGEL, M.: Animal Lepromin with Bacilli from Infected Rats. Preparation and Comparative Study with Human Lepromin. *Internat. J. Leprosy*, 27:59-67, 1959.
- 4 — BERGEL, M.: Estudio histobacteriológico del injerto de tejido lepromatoso en ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes. *Dermatologia Internat.*, 7:23-32, 1968.
- 5 — BINFORD, C. H.: Histiocytic Granulomatous Mycobacterial Lesions Produced in the Golden Hamster (*Cricetus auratus*) Inoculated with Human Leprosy. Negative Results in Experiments Using Other Animals. *Internat. J. Leprosy*, 26:318-324, 1958.
- 6 — BINFORD, C. H.: Studies on a *Mycobacterium* Obtained from the Golden Hamster (*Cricetus auratus*) after Inoculation with Lepromatous Tissue. *Lab. Invest.*, 11:942-955, 1962.
- 7 — CHATTERJEE, K. R.: Experimental Transmission of Human Leprosy infection to a Selected Laboratory-bred Hybrid Black Mouse. *Internat. J. Leprosy*, 26:195-204, 1958.
- 8 — CONVIT, J.: Infections Produced in Hamsters with the Human Leprosy Bacillus. A Critique of Recent Studies. *Internat. J. Leprosy*, 32:310-321, 1964.

- 9 — CONVIT, J., ILUKEVICH, A., LAPENTA, P., and IMAEDA, T.: The Problem of Leprosy Transmission. Discussion of recent Work in Venezuela. Transactions Leonard Wood Memorial Johns Hopkins Univ. Symposium on Research in Leprosy, Baltimore, Md., 257-259, 1961.
- 10 — CONVIT, J., ILUKEVICH, A., LAPENTA, P., e IMAEDA, T.: Inoculación experimental a los animales de laboratorio con *Mycobacterium leprae*. Rev. Venezol. San. y Asist. Soc. 26:388, 1961.
- 11 — CONVIT, J. e ILUKEVICH, A.: La posibilidad vital en el hamster de Bacilos inoculados provenientes de formas Borderline y Lepromatosas. II Reunión Anual de Dermatología, Hospital Univ. de Caracas, 24 a 25 de Junio de 1966. Resúmenes, pág. 8.
- 12 — CONVIT, J., ILUKEVICH, A., LAPENTA, P., e IMAEDA, T.: Nueva orientación sobre la inoculación de la lepra humana a los animales de laboratorio. Memorias de las Jornadas Científicas del Septuagésimo Aniversario del Hospital Vargas, Caracas, 2 a 8 de Julio de 1961.
- 13 — CONVIT, J. und ILUKEVICH, A.: Beitrag zur gelegentlichen Züchtung von Mykobakterien aus menschlichen Lepromen und zur Pathogenität dieser Stämme für Laboratoriumstiere. Internat. Lolloquium über die Variabilität der Mykobakterien unter experimentellen und klinischen Bedingungen, Borstel-Deutschland, 13 a 15 de Octubre de 1965.
- 14 — CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., and IMAEDA, T.: Experimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals. 1º— Clinical, Bacteriologic and Histopathologic Study. Internat. J. Leprosy, 30:239-253, 1962.
- 15 — CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., and IMAEDA, T.: Experimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals III. Internat. J. Leprosy, 32:136-149, 1964.
- 16 — ILUKEVICH, A., y CONVIT, J.: El cultivo de micobacterias a partir de pacientes leprosos. Reunión Anual de Dermatología, Hospital Univ., Caracas, 24 a 25 de Junio de 1966. Resúmenes, pág. 8.
- 17 — ILUKEVICH, A., CONVIT, J., IMAEDA, T., y LAPENTA, P.: Comentarios sobre la situación de las micobacterias en la sistemática actual. Rev. Venezol. San. y Asist. Soc., 29:98-110, 1964.
- 18 — ILUKEVICH, A.: Particularidades bacteriológicas de micobacterias patógenas para el hombre y animales domésticos. 2º

Congreso Venezolano de Salud Pública, 25 de Febrero al 3 de Marzo de 1961.

- 19 — IMAEDA, T., CONVIT, J., ILUKEVICH, A., and LAPENTA, P.: Experimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals. II-Electron Microscope Study. *Internat. J. Leprosy*, 30:395 - 413, 1962.
- 20 — RUNYON, E. H.: Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease. *Med. Clin. N. Amer.*, 43:273, 1959.
- 21 — SHEPARD, C. C.: The Inoculation of Leprosy Bacilli into Mice by the Foot-pad Route. *Transactions Leonard Wood Memorial-Johns Hopkins Univ. Symposium on Research in Leprosy, Baltimore, Md.* pp. 247 - 255, 1961.
- 22 — SHEPARD, C. C.: Considerations of the Application of the Foot Pad Technic in Leprosy Research. *Internat. J. Leprosy*, 33:657-661, 1965.
- 23 — SHEPARD, C. C.: Stability of Mycobacterium leprae and Temperature Optimum for Growth. *Internat. J. Leprosy*, 33:541 - 550, 1965.
- 24 — SOUZA-ARAÚJO de, H. C.: Experiments in Immunology of Leprosy by Means of Inoculation of Patients with Living and Dead Suspensions of Acid-fast Bacilli Cultures. *Departamento de Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil*, 1959.
- 25 — SOULE, M. H.: Cultivation of Mycobacterium leprae. *Internat. J. Leprosy*, 32:195 - 197, 1964 (reprinted from the *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 31:1197 - 1199, 1934).
- 26 — (Cairo Leprosy Congress) Report of the Subcommittee on in vitro cultivation of My. leprae. *Internat. J. Leprosy*, 6:408, 1938.