

INVESTIGACION SEROLOGICA DE LEPTOSPIRA EN PERROS DE BOGOTA

MANUEL JOSÉ TORRES, D. M. V. *

Se comprueba por este trabajo la presencia definitiva de la Leptospirosis canina en el país. Se recomienda el uso de la aglutinación lisis microscópica para la investigación rutinaria de la Leptospirosis.

Este trabajo es una variación del presentado como Tesis de Grado por el doctor Torres (1).

INTRODUCCION

La Leptospirosis es una enfermedad ampliamente distribuida en el mundo. Parece estar ausente solamente en el Sudán y parte de Sudáfrica (2). Colombia es el único país de Latinoamérica que hasta la realización de este trabajo no figura en la literatura internacional cuando se habla de Leptospirosis.

Es una Zoonosis de gran importancia. La padecen todos los mamíferos domésticos y la mayoría de los salvajes. El hom-

bre es, en potencia, el huésped final de la enfermedad.

El objeto de este trabajo fue comprobar la enfermedad en el país, y se complementó por los aislamientos de Manrique et al. (3).

La Leptospirosis fue identificada clínicamente como entidad nosológica específica por Weil (1870), aunque había sido ya descrita por Laudouzy (4).

Stimson (1906) describió un microorganismo en cortes de riñón de un paciente que murió de ictericia aguda y que se diagnosticó como fiebre amarilla (4).

Los japoneses habían estado convencidos de la existencia de la enfermedad de Weil como entidad mucho antes del descubrimiento del agente etiológico.

En noviembre de 1914 Inada et al. (1916) vieron por primera vez esta espiroqueta en el tejido hepático de un curi inoculado con sangre de un paciente que padecía la ictericia aguda. Siempre fracasaron en aislar el organismo de casos de ictericia catarral. Llamaron al germen *Spirochaeta icterohaemorrhagiae*.

* Profesor Asistente de Microbiología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional

Los alemanes por esa misma época habían descubierto la *Leptospira* y la llamaban *Spiroclaeta nodosa* (Hubner y Reiter, 1915 y 1916) (5).

En Inglaterra, Stokes, Ryle y Tittler (1916 y 1917) comprobaron lo hallado por los japoneses en soldados infectados en Francia. Lo mismo hicieron Dawson, Hume y Bedson (1916 y 1917) en casos estudiados en Bélgica. Costa y Troiser (1916) en tropas francesas. Sisto (1917) la halló en el frente italiano (5).

Noguchi (1917 y 1918) estudió la espiroqueta de Inada aislada de casos en Inglaterra, Holanda y los Estados Unidos de América (Wolbach y Binger, 1914). Estos últimos autores hallaron en realidad la *L. biflexa*, que es la única especie saapropita conocida (6).

Noguchi (1919) erróneamente describió a la *Leptospira* como causa de la fiebre amarilla, pues la halló en Guayaquil en una epidemia de esa virosis (6).

En Colombia Muñoz Rivas (1957) examinó tres lotes de sueros humanos y uno de sueros porcinos, encontrando positividad a la aglutinación con antígenos vivos de 4.28% en los sueros humanos (*L. icterohaemorrhagiae*) y 8.9% en los sueros porcinos (*L. pomona*) (7).

Rivera y Manrique (1961) encontraron negatividad a la aglutinación rápida en sueros caninos (8).

Rivera (1961) por microscopia (campo oscuro), inoculaciones, cortes histológicos y fijación de complemento, encuentra negatividad en 140 ratas y 200 sueros de diferentes especies (9).

Manrique (1961) no encontró reactivos positivos en el personal del Matadero Central (10).

Hincapié (1962) con aglutinación rápida encontró 36.0% de sueros bovinos positivos a *L. pomona* (11).

García (1963) repite el experimento en el Matadero de Manzales con resultados positivos en 3 casos. En caballos y bovinos encuentra positividad ante *L. autumnalis* A y *L. pomona* (12).

MATERIAL Y METODOS

Nosotros escogimos el perro, por ser el animal que como huésped de la enfermedad ofrece más posibilidades de transmitir la enfermedad al hombre y al niño especialmente.

Las muestras se obtuvieron de tres grupos de perros:

1) *Perros callejeros*: el grupo más importante como portador y eliminador (orina) de la *Leptospira*; 106 machos y 30 hembras. Las muestras se obtuvieron en el Cosó Municipal y como colaboración de la campaña antirrábica en el Instituto Nacional de Salud.

2) *Perros caseros*: es el grupo receptor más importante y más interesante como transmisor al hombre; 169 machos y 33 hembras.

Las muestras se obtuvieron entre los perros pacientes de la Clínica Externa de la Facultad de Medicina Veterinaria.

La muestra consistía en sangre venosa tomada asépticamente, dejándola coagular en la estufa a 37° C. y centrifugándola cuidadosamente para obtener el suero.

Al principio se utilizó la aglutinación rápida en placas y con antígenos muertos, que pronto se descartó por imprecisa e irregular y por la presentación de demasiadas reacciones cruzadas y autoaglutinación en los antígenos.

Preferimos la aglutinación lisis siguiendo estrictamente la técnica del U. S. Department of Health, Education and Welfare (Galton, 1962) con antígenos vivos (13).

1. Preparación de los antígenos: usamos doce cepas de Leptospiras, gentilmente cedidas por el doctor Casimiro García, de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad de Caldas:

- Nº 1: *L. australis*. Ballico.
- Nº 2: *L. autumnalis*. Akijam.
- Nº 3: *L. ballum*. S-102.
- Nº 4: *L. Bataviae*.
- Nº 5: *L. canicola*. Alarik.
- Nº 6: *L. grippotyphosa*.
- Nº 7: *L. hyos*.
- Nº 11: *L. icterohaemorrhagiae*.
Wignberg.
- Nº 12: *L. hebdomadis*. L. T. 117.
- Nº 13: *L. pomona*. S-91.
- Nº 14: *L. pyrogenes*.
- Nº 15: *L. sejroe*. K. N.

Las cepas enviadas por García se mantenían en medio Fletcher Modificado semisólido * y se hacían resiembras cada 2 meses.

Para la preparación de antígenos se sembraron en medio Stuart (Difco) y se hacían pases cada semana. Al pasar del medio Fletcher Modificado al Stuart se necesitan por lo menos 3 pases para que el organismo adquiera el ritmo de crecimiento y buena densidad y suavidad.

La incubación se hizo siempre a 30° C. La transparencia rápida parece que redu-

ce la formación de "breeding nets" a un mínimo.

Para la obtención del antígeno se sembraba en medio líquido (Stuart) en proporción 1:10, en tubos con tapa de rosca. Después se cultivaban 4-6 días a 28°-30° C. y en cada pase se hizo control de esterilidad en agar suero equino 10% (Difco) que se repetía antes de emplear el antígeno. Esta vez se hacía también examen al campo oscuro para apreciar la calidad (densidad y suavidad) del antígeno. Si aparecía muy denso, se diluía en solución salina amortiguada al 0.85%.

El antígeno más aceptable es aquel que tiene 100-200 leptospiras por campo con ocular 12.5 X y objetivo 40 X.

2. Procedimiento: Los autores nada dicen de inactivar los sueros. Nosotros no encontramos diferencia apreciable entre trabajar con sueros inactivados y no inactivados. Los sueros para este trabajo no fueron inactivados.

Los sueros todos se diluyeron al 1:25 con solución salina (0.85%) amortiguada. Los sueros positivos se diluyeron progresivamente hasta el título máximo positivo. A cada 0.2 ml. de cada una de las diluciones de suero y tubos serológicos se agregó 0.2 ml. de antígeno. Se hacía agitación y luego se incubaba a 30° C. por 3 horas. Luego se hacía el examen al campo oscuro, sin usar cubre-objetos, de las diluciones de cada tubo. Se usaron el objetivo de bajo poder y oculares 15 X. El grado de agitación o lisis o ambos se leían así:

- ++++ Cuando 75-100% de las leptospiras aparecen agrupadas o lisadas.
- +++ 50-75%.
- ++ 25-50%.
- + Menos de 25%.

* Fletcher, 1928. Esterilizar por separado y luego mezclar: Agua destilada, 5.7 ml.; Agar nutritivo, 0.5 ml.; Suero de conejo, 1.0 ml.

García, 1962: a) Esterilizar al autoclave 402 ml. de agua destilada y enfriar a temperatura ambiente; b) Añadir 60 ml. de suero esterilizado de conejo normal (con pequeña cantidad de hemoglobina); c) Inactivar la solución de suero a 56° C. 40 minutos; d) Aún caliente, agregarle 37.5 gramos de agar, extracto de carne corriente, derretido, estéril al 2% (o mejor proteosa 3-Agar de Difco-B65, 9 gramos %. pH 7.2-7.6).

Colocar en tubos de 5 ml. e inactivar a 56° C. 1 hora en 2 días consecutivos

Como título de positividad del suero se conoció la más alta dilución del mismo en que hubo lisis completa (++++). Sólo se consideraron como verdaderamente positivos aquellos sueros con título por lo menos 1:200 y +++++. Anotemos que la literatura da como positivos los sueros con título 1:100.

Siempre se trabajaron sueros control positivo y negativo para cada cepa y cada lote de antígeno.

RESULTADOS:

De 388 sueros caninos analizados por el método de la aglutinación lisis, 115 (30%) se encontraron con títulos positivos a diluciones 1:200 o mayores. La distribución de los sueros positivos (dilución 1:200) ante las 12 cepas antígenos la tenemos en la Tabla N° 1.

Encontramos que la positividad del serotipo *L. canicola* representa casi el doble (23.7%) de la de los dos serotipos que le siguen en porcentajes más altos: *L. pyrogenes* (13.30%) y *L. ballum* (12.20%). Anotamos que en la literatura consultada no encontramos referencias a casos de *L. pyrogenes* o *L. ballum* en perros. El serotipo *L. icterohaemorrhagiae* ocupa el 4º lugar con 4.1%.

Más bajos resultados de positividad se encontraron ante *L. Bataviae* (1.5%), *L. australis* (1.0%) y *L. hyos* (0.2%). Los demás serotipos fueron negativos.

El número total de sueros positivos no está representado por la suma de las parciales por antígeno, ya que como lo comprobaron Murphy et al. (14) (1938)

(13), obtuvimos varios sueros con reacción cruzada frente a varios antígenos. En nuestro caso las reacciones cruzadas se presentaron con:

- L. ballum.*
- L. canicola.*
- L. icterohaemorrhagiae.* y
- L. pyrogenes,*

y especialmente entre los que presentaban títulos altos. En la Tabla N° 2 se aprecian las reacciones entre 10 sueros positivos y los antígenos que más reacción cruzada mostraron en este trabajo.

El título máximo encontrado fue de 1:12.800 en 7 de los sueros, así:

- 4 ante *L. canicola.*
- 2 ante *L. ballum.*
- 2 ante *L. pyrogenes.*

El suero 255 mostró título máximo de 1:12.800 ante los serotipos:

- L. ballum.*
- L. canicola.*

Estos resultados se observan en la Tabla N° 3. De dos casos se logró (Manrique, 1964) (2) aislar sendas cepas de *Leptospira* que el Laboratorio de Microbiología y Bacteriología, Departamento de Salud, Queensland, Australia, identificó como pertenecientes al grupo *L. canicola*. El comportamiento serológico de estos 2 casos se aprecia en la Tabla N° 4

TABLA Nº 1

Serotipo de <i>Leptospira</i>	Nº de sueros analizados	—		%
		—	+	
<i>L. Canicola</i>	388	296	92	23.7
<i>L. Ballum</i>	388	342	46	12.2
<i>L. Pyrogenes</i>	388	335	53	13.7
<i>L. Icterohaemorrhagiae</i>	388	372	16	4.1
<i>L. Bataviae</i>	388	382	6	1.5
<i>L. Australis</i>	388	384	4	1.0
<i>L. Hyos</i>	388	387	1	0.1
<i>L. Grippotyphosa</i>	388	0	0	0
<i>L. Automnalis</i>	388	0	0	0
<i>L. Pomona</i>	388	0	0	0
<i>L. Sejroe</i>	388	0	0	0
<i>L. Hebdomadis</i>	388	0	0	0

Resultados de la aglutinación lisis en los 388 sueros caninos, ante los 12 serotipos de *Leptospira*.

TABLA Nº 2

TITULO DE AGLUTINACION LISIS frente a:

Número de identificación del animal	<i>L. Ballum</i> S-102	<i>L. Canicola</i> Alarik	<i>L. Icterohae-</i> <i>morrhagiae</i> Wignberg	<i>L. Pyrogenes</i>
18	1: 400	1: 1.600	1: 1.600	1: 6.400
27	1: 1.600	1: 6.400	1: 1.600	1: 6.400
50	1: 200	1: 1.600	1: 400	1: 3.200
55	1: 1.600	1: 6.400	1: 6.400	1: 6.400
60	1: 200	1: 1.600	1: 50	1: 3.200
223	1: 800	1: 6.400	1: 6.400	1: 200
230	1: 400	1: 1.600	1: 25	1: 25
235	1: 50	1: 1.000	—	1: 50
161	1: 50	1: 800	1: 25	1: 200
162	1: 100	1: 400	—	1: 200

Reacción cruzada de 6 sueros caninos positivos frente a *L. Canicola*, *L. Pyrogenes*, *L. Icterohaemorrhagiae* y *L. Ballum*.

TABLA N° 3

REACCION CRUZADA EN LOS SUEROS CANINOS QUE MOSTRARON LOS TITULOS MAXIMOS DE AGLUTINACION LISIS

N° del suero	L. Ballum	ICT.	L. Canicola	L. Pyrogenes
100	1: 200	—	—	1: 2.800
102	1: 200	1: 400	1: 12.800	—
113	—	1: 6.400	1: 800	1: 12.800
231	1: 200	—	1: 2.800	1: 25
34	1: 1.600	1: 50	1: 12.800	1: 1.600
255	1: 12.800	1: 400	1: 12.800	1: 3.200
271	1: 12.800	1: 800	1: 6.400	1: 3.200

TABLA N° 4

COMPORTAMIENTO DE LOS SUEROS DE LOS CASOS EN LOS CUALES SE LOGRO AISLAR LEPTOSPIRAS, ANTE LOS 12 ANTIGENOS CON LA REACCION AGLUTINACION LISIS

N° de identificación de los sueros.												
	L. BALLUM.	L. CANICOLA.	L. ICTERHAEMORRHAGIAE.	L. BATAVIAE.	L. CRIPPTYPHOSA.	L. PYROGENES.	L. AUTOMNALIS	L. POMONA.	L. SEJROE.	L. HYOS.	L. AUSTRALIS	L. HEBDOMADIS T 118.
33	1: 800	1: 1.600	1: 50	—	—	1: 100	—	—	—	—	1: 25	—
34	1: 1.600	1: 12.800	1: 50	—	—	1: 1.600	—	—	—	—	—	—

DISCUSION:

Por este trabajo y el continuado por Manrique et al. (1964) se hace por primera vez en el país una investigación por medio de la aglutinación lisis para investigar la Leptospirosis canina en el país y se comprueba también por primera vez la *L. canicola*.

Es evidente por este trabajo y por los otros semejantes realizados en el país que la Leptospirosis existe en el país, seguramente no sólo en los caninos sino en otras especies, inclusive el hombre.

Los serotipos más comunes y predominantes en el perro son, según este trabajo: *L. canicola*, *L. pyrogenes* y *L. ballum* en porcentajes considerables. Luego la *L. icterohaemorrhagiae*, y la siguen con porcentajes bajos la *L. Bataviae*, *L. australis* y *L. hyos*.

Como consecuencia inmediata de este trabajo se consigue el primer aislamiento de Leptospiras, que son clasificadas como serotipos *L. canicola*, de la orina de 2 perros que habían mostrado por este trabajo positividad al título máximo ante ese serotipo y títulos altos ante otros serotipos (2).

Recomendamos, por tanto:

- 1) Repetir este tipo de trabajo en humanos y animales.
- 2) Dar nueva importancia en las cátedras de Salud Pública del país a esta

Zoonosis que queda definitivamente comprobada.

- 3) Establecer como análisis corriente rutinario en la Clínica Canina la aglutinación lisis, y ojalá los cultivos de orina ante todo caso de ictericia, diátesis hemorrágica, hepatitis y sobre todo nefritis crónica.

RESUMEN:

Se utiliza por primera vez en el país el método de la aglutinación lisis para diagnóstico de la Leptospirosis canina. Se encuentra positividad considerable a *L. canicola*, con títulos máximos de positividad en diluciones hasta 1:12.800; de dos casos que mostraron esta alta reactividad se aíslan sendas cepas de *L. canicola*.

Otros serotipos con considerable positividad fueron la *L. pyrogenes*, *L. ballum* y *L. icterohaemorrhagiae*.

Se comprueba definitivamente la existencia de esta Zoonosis en Colombia.

AGRADECIMIENTOS:

Este trabajo no hubiera podido realizarse sin la colaboración del doctor Roy Casorso y del doctor Gustavo Manrique, del Programa de Patología Animal del ICA.

REFERENCIAS

1. TORRES, M. J.: Investigación Serológica de *Leptospirosis* en perros de Bogotá. Tesis de Grado. Fac. de Med. Vet. Zoot., Bogotá, 1964.
2. ALSTON, J. M. and BROOM, J. C.: *Leptospirosis in Man and Animals*. 1st ed., Edinburgh and London E. & S., Livingstone, 1958.
3. MANRIQUE G. et al.: Aislamiento de *Leptospira canicola* en perros de la ciudad de Bogotá. *Ganadería Colombiana*, 3: 97-112 (julio-octubre 1962).
4. WEIL, STIMSON, LAUDOUZY. Citados por Alston and Broom.
5. HUBENER y REITTER, STOKES et al., DAWSON et al., COSTA y TROISER, SISTO: Citados por Alston and Broom.
6. NOGUCHI, INADA. Citados por Alston and Broom.
7. MUÑOZ RIVAS, G.: Existe la *Leptospirosis* en Colombia. *Rev. Fac. Med. Vet. y Zoot.*, Bogotá, 21: 590-594 (número 118-1957).
8. RIVERA O. y MANRIQUE G.: Datos no publicados, 1961.
9. RIVERA O.: Investigaciones sobre *Leptospirosis*. *Veterinaria Colombiana* 1 (número 1, 1961): 65-65.
10. MANRIQUE G.: Datos no publicados, 1961.
11. HINCAPIÉ, O.: Datos no publicados, D.I.A. Patología, 1962.
12. GARCÍA, C.: Resumen y conclusiones del trabajo titulado "*Leptospirosis*". *Ganadería Colombiana* 2: (julio-agosto, 1963): 135-136.
13. GALTON, M. et al.: *Leptospirosis, Clinical Manifestations in Man and Animals, Methods in Laboratory Diagnosis*. U. S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service Communicable Disease Center, Atlanta, 1962.
14. MURTHY, L. C., et al.: Prevalence of Agglutinins in Canine Serums to Serotypes other than *L. canicola* and *L. icterohaemorrhagiae*. Report of Isolation of *L. pomona* from a Dog. *A. J. Vet. Res.* (January, 1958): 1945-1951.