

LEPTOSPIROSIS EN EL PERU. II.—INCIDENCIA DE LA INFECCION EN LAS RATAS (*RATTUS NORVEGICUS*) DE LA CIUDAD DE LIMA E IDENTIFICACION DE LA CEPA INFECTANTE.

ARÍSTIDES HERRER y JULIA LICERAS DE HIDALGO

División de Estudios Epidemiológicos e Investigaciones Especiales
del Instituto Nacional de Salud Pública. Lima, Perú.

Como se mencionó en artículo anterior (HERRER, LICERAS y MENESES, 1958), entre mayo de 1955 y diciembre de 1957 en el Instituto Nacional de Salud Pública realizamos estudios sobre la leptospirosis en perros y ratas, teniendo como finalidad fundamental el determinar las cepas serológicas de leptospiras existentes en tales animales, la incidencia de la infección y otras características epidemiológicas de la misma.

Aunque en varias oportunidades se han efectuado investigaciones acerca de la leptospirosis, tanto humana (ARCE y RIBEYRO, 1917; CUADRA, 1955), así como murina (RIBEYRO, 1918; ROGGERO, 1946; AYULO y DAMMERT, 1947) en la ciudad de Lima, no se ha determinado aún las cepas serológicas de leptospiras presentes en esta localidad. Por tal razón, al efectuar los estudios cuyos resultados se ofrecen en esta oportunidad, se puso especial atención en la identificación serológica de las cepas que se aislaran.

MATERIAL Y METODOS

1. *Procedencia de las ratas y edad aproximada de las mismas.*
A excepción tan sólo de seis especímenes, todas las ratas utilizadas procedían de varios mercados de abastos de la ciudad de Lima. La captura la realizaba el personal especializado que al respecto tiene el Departamento de Epidemiología de la División de Enfermedades Transmisibles, Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social del Perú. Las

ratas eran capturadas vivas, individualmente, en trampas de alambre, durante la noche; luego, para facilitar su transporte, al día siguiente se juntaban varias en una jaula de mayores dimensiones. En estas condiciones las trasladaban al Instituto Nacional de Salud Pública, donde eran utilizadas al día siguiente o subsiguiente de ser capturadas. El total de ratas estudiadas es de 600, todas pertenecientes a la especie *Rattus norvegicus* y conocida vulgarmente con el nombre de "rata de los desagües".

Con el fin de diferenciar aproximadamente los especímenes tiernos de los adultos, antes de ser autopsiadas se determinaba en cada rata la longitud existente entre el extremo del hocico y la base del rabo, considerándose como adultas a las que median 18 centímetros o más. De acuerdo con este criterio, de las 600 ratas estudiadas 82 fueron tiernas y 518 adultas.

2. *Investigaciones realizadas.* Salvo casos excepcionales, en todas las ratas se realizaron las siguientes investigaciones: a) cultivos del riñón y de la sangre; b) observaciones al campo oscuro del triturado del riñón; y c) reacciones serológicas de aglutinación —lisis. Además, para investigaciones ulteriores, un trozo de riñón se fijaba en formol al 10 por ciento y, de la sangre del rabo o del corazón, se preparaba frotis y gota gruesa.

a) *Cultivo.* Después de ser anestesiadas con éter sulfúrico las ratas eran autopsiadas. En primer lugar se tomaba sangre del corazón para los hemocultivos (dos tubos) y la obtención del suero para las reacciones de aglutinación-lisis. En seguida, de uno de los riñones, punzándosele con una pipeta Pasteur, se tomaba material para inocular tres tubos de medio de cultivo. De los cinco tubos de cultivo que se hacía en cada caso, tres (dos del riñón y uno de sangre) eran en el medio de Vervoort modificado (WOLFF, 1954) y los dos restantes en el medio de Noguchi para leptospiros.

Los cultivos eran revisados al campo oscuro dos o tres veces en el lapso de un mes, después de lo cual se desechaban los que resultaban negativos. Las observaciones microscópicas se efectuaban a aumentos de 120 diámetros y, en los casos de duda, se recurría a la resiembra para conocer el resultado de tales cultivos.

b) *Observaciones microscópicas del triturado de riñón.* Con tijeras y dentro de una caja Petri, el mismo riñón del que se había hecho los cultivos era triturado en 1 a 2 cc. de solución salina al 0.85 por cien-

to estéril. De la suspensión resultante se tomaba una pequeña cantidad a fin de ser observada al campo oscuro, para lo cual la preparación era cubierta con una laminilla de vidrio. Entre el condensador y la lámina porta objetos se colocaba agua destilada y las observaciones se realizaban a 360 diámetros de aumento. Tan sólo en casos excepcionales se hizo necesario recurrir a la observación con la lente de inmersión (en aceite), usando entonces aumento de 950 diámetros.

c) *Reacciones serológicas.* Empleando como antígeno cultivos en el medio de Vervoort modificado (WOLFF, 1954; HERRER et al., 1958), de una a tres semanas de edad, se realizaron las reacciones de aglutinación-lisis con las siguientes cepas serológicas de leptospiras: *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, *L. canicola* Ruebush, *L. autumnalis* AB Akiyama A, *L. bataviae* Van Tienen, *L. sejroe* Mallersdorf, *L. pomona* S91, *L. ballum* S102, *L. hycs*, *L. grippotyphosa* Moscow V, *L. hebdomadis*, y *L. pyrogenes* Salinem. Estas 11 cepas, utilizadas como referencia, fueron obtenidas en marzo de 1955 del Leptospira Research Laboratory, Communicable Disease Center, Chamblee, Georgia. Con fines comparativos, además, en 418 ratas se utilizó también dos cepas (R23 y R410) aisladas por los autores, de sendas ratas, e identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*.

Para efectuar las reacciones, el suero de las ratas era diluido a 1:10, 1:100, y 1:1,000 con solución salina estéril al 0.85 por ciento. De cada una de estas diluciones, 0.1 cc. era mezclado con igual cantidad del cultivo utilizado como antígeno, en tubitos de sedimentación de Kahn. Después de agitar convenientemente dicha mezcla se la dejaba durante 20 a 24 horas a la temperatura del laboratorio (18 a 20°C.). Después se realizaba la lectura al microscopio de campo oscuro con un aumento de 120 diámetros, colocando agua destilada entre el condensador y la lámina porta-objetos. El grado de las reacciones se expresaba por medio de cruces, correspondiendo cuatro cruces a las reacciones de máxima intensidad, esto es, a aquellas en las que las leptospiras fueran lisadas o aglutinadas casi en su totalidad; y, una cruz, a las reacciones débiles, con más o menos la cuarta parte de los microorganismos lisados o aglutinados. Dos cruces correspondían a las reacciones de mediana intensidad. Se consideraba como positivo al suero que reaccionaba a una dilución de 1:100 o mayor con la intensidad de dos cruces. Los sueros positivos eran titulados posteriormente, para lo cual se empleaba diluciones de 1:100, 1:300, 1:1,000, 1:3,000, 1:10,000, y 1:30,000.

d) *Identificación de las cepas aisladas.* La mayoría de las cepas aisladas fueron identificadas. Para esto, utilizándolas como antígeno se las ponía frente a los sueros inmunes correspondientes a las 11 cepas que se usaron como referencia. Tan sólo en tres ocasiones se prepararon sueros inmunes de cepas aisladas de ratas, siguiendo la técnica que sugiere WOLFF (1954). En el cultivo de las cepas empleadas como antígeno se utilizó el medio de Vervoort modificado.

RESULTADOS

1. *Cultivos. Relación entre sus resultados, la procedencia y sexo de las ratas, así como con las estaciones del año.* En las 600 ratas se consiguió realizar el cultivo del riñón, obteniendo 282 (49.0%) positivos y 25 contaminados. Tales resultados están expuestos en el cuadro I, siendo necesario agregar las siguientes informaciones:

a) Las ratas con las que se ha trabajado procedían de siete sectores diferentes de la ciudad de Lima, en seis de los cuales se trataba de mercados de abastos. Las condiciones de higiene y almacenamiento de los artículos que se expenden son semejantes en todos los referidos mercados, los que están ubicados en diversas zonas de la ciudad y a distancias que varían entre 200 y 800 metros entre uno y otro mercado. Dada la separación que hay entre ellos, parece poco probable que las ratas de un mercado dado frecuentasen otros. De esta manera, las ratas estudiadas, por su número y variada procedencia, sin duda son representativas de la ciudad de Lima. Los resultados parciales obtenidos en los cultivos de riñón, de acuerdo con la procedencia de los animales, son los siguientes:

CUADRO I.— Resultados del cultivo de riñón para leptospira en las ratas de la ciudad de Lima.

	1955			1956			1957			1955 — 1957			
	Tot.	POS.	Con.	Tot.	POS.	Con.	Tot.	POS.	Con.	TOTAL POSIT.	Cont.	Porcen.	
ENERO							32	13	1	32	13	1	41.9
FEBRERO							26	14		26	14		53.8
MARZO				48	17	7	19	10		67	27	7	45.0
ABRIL				44	26	1	11	6		55	32	1	59.3
MAYO	59	23	7				38	14	2	97	37	9	42.0
JUNIO				66	21	2	11	5		77	26	2	34.7
JULIO				26	13	1	20	10		46	23	1	51.1
AGOSTO				13	6		28	16	1	41	22	1	55.0
SETIEMBRE				25	14		12	6		37	20		54.0
OCTUBRE				5		1	43	27		48	27	1	57.4
NOVIEMBRE							27	15	1	27	15	1	57.6
DICIEMBRE				10	7		37	19	1	47	26	1	56.5
T O T A L	59	23	7	237	104	12	304	155	6	600	282	25	49.0

Procedencia	Ratas estudiadas	Cultivos positivos	Cultivos contaminados	Porcentaje de infección
Mercado Central	323	151	15	49.0%
Mercado Chacra Colorada	106	54	3	52.4 „
Mercado Baratillo (Rimac)	95	48	3	52.2 „
Mercado La Aurora	48	18	1	38.3 „
Mercado Limoncillo	12	6	1	54.5 „
Mercado Mayorista	10	4	1	44.4 „
Varios	6	1	1	20.0 „
TOTALES	600	282	25	49.0 „

De acuerdo con la relación anterior, la infección de las ratas capturadas en los mercados varió entre 38.3 (La Aurora) y 54.5 (Limoncillo) por ciento. Las procedentes de lugares diferentes a los mercados de abastos, por su reducido número, sin duda no tienen mayor importancia en lo que concierne con la incidencia de la infección.

b) En relación con las estaciones del año, la proporción de cultivos positivos, del riñón, ha sido de 46.2, 43.8, 53.4, y 57.1 por ciento, en el verano, otoño, invierno y primavera, respectivamente.

Hemocultivos. En 597 ratas se consiguió realizar hemocultivos, de los cuales siete (1.2%) ofrecieron resultados positivos y 32 se contaminaron. De los siete casos con hemocultivo positivo, tres fueron negativos tanto a la observación al campo oscuro así como al cultivo de riñón. Por otro lado, el suero de las siete ratas con cultivo de la sangre positivo ofrecieron resultados negativos en la reacción de aglutinación-lisis.

2. *Observaciones al campo oscuro.* En las 600 ratas se efectuaron las observaciones microscópicas al campo oscuro del triturado de riñón, en 156 (26.0%) de las cuales se logró observar leptospiras. Los pormenores de estos estudios están expuestos en el cuadro II.

3. *Presencia de anticuerpos en la sangre de las ratas.* Utilizando la reacción de aglutinación-lisis y las 11 cepas serológicas de leptospiras ya mencionadas, en 594 casos fue posible investigar la presencia de anticuerpos en la sangre de las ratas. En el cuadro III se hallan los resultados de tales observaciones, indicando por meses los diversos pormenores. Como muestra el referido cuadro, en 195 ratas (32.8%) se

CUADRO II.— *Resultados de la observación al campo oscuro del triturado de riñón en las ratas de la ciudad de Lima*

	1955		1956		1957		1955 - 1957		
	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	TOTAL	POSIT.	Porcent.
ENERO					32	5	32	5	15.6
FEBRERO					26	6	26	6	23.1
MARZO			48	15	19	9	67	24	35.8
ABRIL			44	14	11	2	55	16	29.1
MAYO	59	20			38	5	97	25	25.8
JUNIO			66	14	11	1	77	15	19.5
JULIO			26	7	20	5	46	12	26.1
AGOSTO			13	2	28	11	41	13	31.7
SETIEMBRE			25	6	12		37	6	16.2
OCTUBRE			5		43	14	48	14	29.2
NOVIEMBRE					27	10	27	10	37.0
DICIEMBRE			10	3	37	7	47	10	21.3
TOTAL	59	20	237	61	304	75	600	156	26.0

CUADRO III.— *Presencia de anticuerpos contra la Leptospira icterohaemorrhagiae AB Wijnberg en la sangre de las ratas de la ciudad de Lima.*

	1955		1956		1957		1955 - 1957		
	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	TOTAL	POSIT.	Percent.
ENERO					32	11	32	11	34.4
FEBRERO					26	4	26	4	15.4
MARZO			48	17	19	6	67	23	34.3
ABRIL			42	6	11	1	53	7	13.2
MAYO	59	34			36	13	95	47	49.5
JUNIO			66	15	10	3	76	18	23.7
JULIO			25	5	20	12	45	17	37.8
AGOSTO			13	3	28	9	41	12	29.3
SETIEMBRE			25	6	12	4	37	10	27.0
OCTUBRE			5		43	16	48	16	33.3
NOVIEMBRE					27	13	27	13	48.2
DICIEMBRE			10	4	37	13	47	17	36.2
T O T A L	59	34	234	56	301	105	594	195	32.8

consiguió verificar la presencia de anticuerpos a título de 1:100 o mayor frente a alguna de las 11 cepas de referencia. A continuación se indica las diluciones a las que reaccionaran los sueros, así como las respectivas proporciones en que lo hicieron:

Dilución del suero	Sueros positivos	% en relación al Nº de positivos
1:100	107	54.9 %
1:300	66	33.8 „
1:1,000	13	6.6 „
1:3,000	9	4.7 „
	195	100.0

Una característica observada de manera constante fue el que las reacciones ofrecieran títulos relativamente bajos. Suponiendo que esto podría deberse al hecho de usar como antígeno cepas de leptospiras procedentes de regiones distantes del Perú, en 418 muestras de suero se realizaron las reacciones empleando, además de las 11 ya mencionadas, dos cepas (R23 y R410) aisladas de sendas ratas por los autores y que fueran identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*. Con tales cepas peruanas fueron más altos, tanto la incidencia de la infección así como el título de las respectivas reacciones serológicas (cuadro VI).

También fue notable la pequeña proporción de sueros que reaccionaran con antígenos diferentes al de *L. icterohaemorrhagiae* u ofrecieran reacciones cruzadas, contrariamente a lo observado en perros, por los mismos autores y usando la misma técnica y antígenos (HERRER. LICERAS y MENESES, 1958). En efecto, del total de 195 sueros positivos, 167 (85.6%) reaccionaron únicamente frente al antígeno de *L. icterohaemorrhagiae*. Seis, del mismo modo, también frente a un sólo antígeno pero diferente al anterior, correspondiendo dos a *L. hyos*, dos a *L. pyrogenes*, uno a *L. autumnalis* y el restante a *L. sejroe*, logrando aislar e identificar como *L. icterohaemorrhagiae* la cepa infectante del último caso mencionado; también se aisló en cultivo la cepa infectante de la rata cuyo suero reaccionara con el antígeno de *L. autumnalis*, pero no se llegó a identificarla. El título de las reacciones en estos casos fluctuaron entre 1:100 y 1:300.

En los 22 (11.3%) casos restantes se presentaron reacciones cruzadas, observándose, sin embargo, la presencia de anticuerpos correspondientes a *L. icterohaemorrhagiae* en todos ellos. Las reacciones cruzadas más frecuentes fueron entre *L. pyrogenes* y *L. icterohaemorrhagiae* (17 de los 22 casos). Por otro lado, en 18 de ellos se consiguió aislar en cultivo la cepa infectante, de las cuales 15 fueron identificadas, correspondiendo todas a *L. icterohaemorrhagiae* *.

4. *Relación entre la presencia de anticuerpos en la sangre y la infección de las ratas.* En 139 (71.2%) de las 195 ratas serológicamente positivas se logró verificar la infección por medio de los cultivos o la observación al campo oscuro del triturado del riñón; y tan sólo en las 56 (28.7%) ratas restantes, con anticuerpos en la sangre, no fue posible comprobar la presencia de leptospiras. En estos casos el título de la reacción serológica no ofreció nada especial, pues fluctuó con regularidad entre 1:100 y 1:3,000. Por otro lado, en 173 ratas en las que se verificó la infección, la reacción de aglutinación-lisis fue negativa; sin embargo, en 109 de tales casos en los que se identificaran las respectivas cepas infectantes, éstas resultaron en su totalidad corresponder a *L. icterohaemorrhagiae*.

5. *Aislamiento de las cepas y su identificación serológica.* En total se aislaron 285 ** cepas de leptospiras, 203 de las cuales fueron puestas frente a los anti-sueros correspondientes a las 11 cepas seroló-

* Estos resultados indican sin duda que, tales reacciones cruzadas con *L. pyrogenes*, son de carácter inespecífico en el suero de las ratas de Lima.

En investigaciones anteriores (HERRER et al., 1958) también fueron observados con frecuencia anticuerpos correspondientes a *L. pyrogenes* en el suero de perros de varias localidades peruanas. Sin embargo, en vista de que dicho fenómeno se observara en la mayoría de los sueros positivos para *L. canicola*, se consideró que carecerían de especificidad y no se mencionó el hecho en la citada publicación. Además, en 17 de 21 perros en los cuales se aislara e identificara como *L. canicola* la respectiva cepa infectante, se verificó la presencia de anticuerpos de *L. pyrogenes*, en un caso a título de 1:3,000 (igual al título homólogo); en cuatro, a 1:1,000; y, en los 12 restantes, entre 1:10 y 1:300.

** En realidad se obtuvieron 289 cultivos positivos, 282 del riñón y 7 de la sangre. Pero, como cuatro de las ratas con hemocultivo positivo lo fueran también al cultivo del riñón, las leptospiras aisladas se consideran como pertenecientes a una sola cepa en cada uno de estos cuatro casos.

gicas que se usaran como referencia, siendo todas identificadas como *L. icterohaemorrhagiae**.

DISCUSION

1. *Valor diagnóstico de los métodos empleados.* Por el detenimiento con que se han realizado los estudios cuyos resultados se exponen en esta ocasión, así como por la regularidad con que han sido empleados los diversos métodos tendientes a verificar la incidencia de la leptospirosis en las ratas, es posible discutir acerca del valor de cada uno de ellos. Resumiendo las cifras que se han expuesto en páginas anteriores, de acuerdo con cada método empleado, se tiene lo siguiente:

Método empleado	Total ratas estudiadas	Ratas positivas	Incidencia de la infección
a Hemocultivo	597 (32)**	7***	1.2 %
b Campo oscuro	600	156	26.0 ..
c Reacción serológica	594	195	32.8 ..
d Cultivo del riñón	600 (25)	282	49.0 ..
e Los 4 métodos en conjunto	591 (43)	342	62.4 ..

De acuerdo con el sumario anterior se puede hacer los comentarios siguientes:

a) El cultivo del riñón sería la técnica que ofrece mejores resultados al investigar la incidencia de la leptospirosis murina en las condiciones que

* Con los anti-sueros correspondientes a *L. pyrogenes* y *L. sejroe* de procedencia norteamericana (utilizadas al principio), las cepas aisladas solian ofrecer reacciones cruzadas, frecuentemente a título bastante alto frente al anti-suero de *L. pyrogenes*. Tales reacciones cruzadas desaparecieron desde que se empezó a usar anti-sueros preparados por los autores; pero, al mismo tiempo, se comenzó a observar reacciones cruzadas de mediana intensidad con el anti-suero de *L. pomona*. Por lo demás, han sido poco frecuentes las reacciones cruzadas entre las cepas aisladas de las ratas y el suero inmune anti *L. canicola*.

** Las cifras encerradas entre paréntesis indican el número de cultivos contaminados.

*** De las siete ratas con hemocultivos positivos, tres lo fueron también al cultivo de riñón; una, al campo oscuro y al cultivo de riñón; y, las tres restantes, positivas únicamente al hemocultivo.

lo hemos realizado. Y, desde que se trata de un método que permite aislar al agente etiológico, su valor se acrecienta de manera notable. Sin embargo, autores como LARSON (1943), que han utilizado también simultáneamente varios métodos de diagnóstico en la leptospirosis murina, encuentran que el cultivo del riñón no ofrece resultados tan buenos como los obtenidos por nosotros. Para el mencionado autor este método sería inferior a la observación al campo oscuro del triturado del riñón, así como a la observación microscópica de cortes histológicos de dicho órgano. La discrepancia existente en los resultados obtenidos con el método del cultivo del riñón entre LARSON y nosotros, creemos sea debido a la técnica y al medio empleados en los cultivos. En efecto, si se logra verificar la presencia de leptospiras en el riñón de las ratas, ya sea por medio del campo oscuro o de los cortes histológicos, sería difícil explicar como los respectivos cultivos puedan resultar negativos.

b) La proporción de positivos obtenidos en las reacciones serológicas de aglutinación-lisis (32.8%) es relativamente tan baja que obliga buscar alguna explicación al respecto, sobre todo al observar que es notablemente inferior a lo encontrado por medio del cultivo del riñón. Como se sabe, de manera general en la leptospirosis la reacción serológica ofrece cifras considerablemente elevadas, debido a que los anticuerpos persisten por considerable lapso después que las leptospiras han desaparecido del animal infectado. Y, aunque en el caso particular de la rata se acepta que la leptospiremia suele ser notablemente prolongada (THIEL, 1948; RUYS et al., 1948), los resultados de algunas investigaciones en las cuales se emplearon el referido método serológico simultáneamente con otros que permiten verificar la presencia de las leptospiras (observaciones microscópicas, cultivos, e inoculaciones), indicarían que la reacción serológica es el método diagnóstico con el que se obtiene mejores resultados (LANGWORTHY y MOORE, 1927; LARSON, 1943; GUIDA, 1950), lo que está en contradicción con lo verificado por nosotros.

Ya se ha indicado que durante nuestros estudios obtuvimos 173 ratas, realmente infectadas, pero que ofrecieran resultados negativos a la reacción serológica, lo que explicaría la baja incidencia de la infección determinada por los autores con el método serológico, así como la discrepancia existente entre los resultados obtenidos por nosotros y los de algunos otros autores. El que ratas (*R. norvegicus*) infectadas por

la *L. icterohaemorrhagiae* suelen ofrecer reacción serológica negativa frente a la respectiva cepa homóloga, es un fenómeno ya conocido (Ruys et al., 1948) pero no bien explicado. Y, en esta oportunidad cabe relieves la elevada proporción en que dicho fenómeno puede presentarse.

c) La observación al campo oscuro del triturado de riñón ha sido positiva en el 26.0 por ciento, lo que es notablemente inferior a los resultados obtenidos por medio del cultivo del referido órgano. Es de suponer que el campo oscuro como método de diagnóstico de la leptospirosis tenga notables limitaciones, debido principalmente a la pequeña cantidad de material que se observa. Y, en cuanto al hemocultivo, no podría ser este considerado como método de diagnóstico, desde que es tan sólo transitoria la presencia de las leptospiras en la sangre de los animales infectados.

2. *Incidencia de la infección.* En 591 casos en los que fuera posible realizar simultáneamente la reacción de aglutinación-lisis, los cultivos, y la observación al campo oscuro de triturados del riñón, se obtuvo 342 positivos, lo que equivale a una incidencia de 62.4 por ciento (Cuadro IV). Considerando los resultados que ofrecen las reacciones serológicas (tan sólo 32.8%) surge la impresión en el sentido de que aún la referida incidencia de 62.4 por ciento estaría posiblemente por debajo de la realidad, una de las principales causas podría ser quizás el biotipo de la *L. icterohaemorrhagiae* usado como antígeno en tales reacciones. Así parecen indicar los resultados comparativos de reacciones de aglutinación-lisis realizadas en 418 casos (Cuadro VI), en los que se empleó como antígeno tanto la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg así como dos cepas aisladas por nosotros de ratas e identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*.

CUADRO IV.— *Incidencia de la leptospirosis murina en la ciudad de Lima, determinada a base de: 1) la reacción serológica de aglutinación-lisis, 2) observación al campo oscuro del triturado de riñón; y 3) cultivos de la sangre y del riñón.*

	1955		1956		1957		1955 - 1957		
	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	Total	Posit.	Porcent.
ENERO					32(1)*	16	32(1)	16	51.6
FEBRERO					26	15	26	15	57.7
MARZO			45(15)	15	19	12	64(15)	27	55.1
ABRIL			42(1)	28	11	6	53(1)	34	65.4
MAYO	59(7)	34			36(1)	23	95(8)	57	65.5
JUNIO			66(6)	26	10	5	76(6)	31	44.4
JULIO			25(4)	15	20	17	45(4)	32	78.0
AGOSTO			13	7	28(1)	18	41(1)	25	62.5
SETIEMBRE			25(1)	18	12	7	37(1)	25	65.8
OCTUBRE			5(1)		43(3)	30	48(4)	30	68.2
NOVIEMBRE					27(1)	19	27(1)	19	73.1
DICIEMBRE			10	8	37(1)	23	47(1)	31	67.4
T O T A L	59(7)	34	231(28)	117	301(8)	191	591(43)	342	62.4

* Las cifras encerradas entre paréntesis indican el número de casos no considerados, por contaminación del respectivo cultivo.

Como se sabe, la incidencia de la leptospirosis murina varía grandemente no sólo de acuerdo con la especie de rata de que se trate, sino también en relación con ciertas condiciones locales. Por esto no es prudente hacer comparaciones si previamente no se conoce con exactitud las condiciones bajo las cuales se han realizado las investigaciones. En este sentido son frecuentes los casos en los que, aún dentro de una misma ciudad, la incidencia varía en forma notable de un sector a otro (SAVINO y ANCHEZAR, 1942; RISLAKKY y SALMINEN, 1955). Teniendo en cuenta tales circunstancias, que limitan el valor de las comparaciones, indicaremos solamente como en Finlandia han encontrado infectado al *Rat. us norvegicus* en el 62.0 por ciento, determinando a base de cultivos del riñón (RISLAKKY y SALMINEN, 1955).

En cuanto al Perú, AYULO y DAMMERT (1947) verificaron la infección del *R. norvegicus* en el 28.3 por ciento, en la ciudad de Lima, utilizando como método de diagnóstico la observación microscópica de cortes del riñón coloreados por la técnica de Levaditi. Teniendo en cuenta que las ratas con las que trabajaran dichos autores procedían de la misma localidad que las utilizadas por nosotros, del mismo modo que en ambas ocasiones fueran capturadas por el mismo personal especializado del Ministerio de Salud Pública, los resultados que hemos obtenido por medio del cultivo del riñón indican una infección más alta. Esto seguramente se debe a la diferente técnica de estudio que se ha empleado y no a variaciones temporales en la incidencia de la leptospirosis murina en la ciudad de Lima.

3. *Incidencia de la infección en relación con la edad y el sexo de las ratas.* De acuerdo con lo que se indica en otro lugar, fueron consideradas como adultas las ratas que medían 18 centímetros o más desde la base del rabo al extremo del hocico y, tiernas, las que tenían dimensiones inferiores. Diferenciadas así las ratas, se ha determinado comparativamente la incidencia de la infección en ambos grupos, lo que se resume en el cuadro V. En dicho cuadro están expuestos también los resultados obtenidos en relación con el sexo de los animales estudiados.

Excepción hecha del hemocultivo, los resultados de nuestros estudios están de acuerdo con lo que se acepta en relación a la incidencia de la leptospirosis y la edad de las ratas, vale decir, que la infección es más frecuente en los especímenes adultos. Se explica esto teniendo en cuenta que la incidencia de la infección está en relación directa con el tiempo de exposición de los animales. También es explica-

CUADRO V.— Incidencia de la leptospirosis en relación con la edad y sexo de las ratas en la ciudad de Lima.

Método empleado	Ratas consideradas	Incidencia de la infección											
		En relación con la edad						En relación con el sexo					
		Adultas			Tiernas			Machos			Hembras		
		Total	Posit.	%	Total	Posit.	%	Total	Posit.	%	Total	Posit.	%
a) Hemocultivo	597(32)*	515(28)	4	0.8	82(4)	3	3.8	291(15)	4	1.4	306(17)	3	1.0
b) Campo obscuro	600	518	143	27.6	82	13	15.9	294	92	31.3	306	64	20.9
c) Serología	594	518	178	34.6	80	17	21.3	291	91	31.3	303	104	34.3
d) Cultivo riñón	600(25)	518(18)	262	52.4	82(7)	20	26.7	294(12)	154	54.6	306(13)	128	43.7
e) Los cuatro métodos simultáneamente.	591(43)	511(36)	309	65.1	80(7)	33	45.2	288(23)	174	64.5	303(20)	168	59.3

* Las cifras encerradas entre paréntesis indican el número de animales que no se consideran en cada caso, debido a la contaminación de los respectivos cultivos.

ble la mayor leptospiremia verificada en las ratas tiernas, desde que las leptospiras se encuentran en la sangre tan sólo durante el inicio de la infección.

En lo que respecta a la incidencia de la infección en relación con el sexo de las ratas, nuestros estudios indicarían que es ligeramente mayor en los machos, contrariamente a lo determinado por LARSON (1943). Sin embargo, la diferencia observada por nosotros no es tan marcada. Por lo demás, no parece que el *R. norvegicus* tenga hábitos que predispongan a los especímenes de un sexo con mayor frecuencia que a los del otro, tal como sucede en el perro.

4. *Cepa serológica de leptospira que infecta al R. norvegicus en la ciudad de Lima y su relación con los anticuerpos verificados en la sangre.* De acuerdo con nuestros estudios las ratas de la ciudad de Lima (*R. norvegicus*) estarían infectadas únicamente por la *L. icterohaemorrhagiae*. Pues, como ya se ha mencionado, por medio de los antisueros correspondientes a las 11 cepas serológicas utilizadas como referencia, fueron estudiadas 203 cepas aisladas de ratas, las que en su totalidad llegaron a ser identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*. Hubo un regular número de ratas cuyo suero reaccionara con algunos antígenos diferentes al de la cepa mencionada o presentaran reacciones cruzadas, no obstante lo cual en los casos (16) que se aislara e identificara la cepa infectante, éstas también correspondieron a la *L. icterohaemorrhagiae*. Por consiguiente, la presencia de anticuerpos diferentes a los de la mencionada cepa, verificados en la sangre de las ratas de Lima, serían tan sólo de carácter para-específico.

Las ratas con las que hemos trabajado, procedentes de varios mercados de abastos de la ciudad de Lima, parece que no tienen oportunidad de ponerse en contacto con otros animales que alberguen cepas diferentes de leptospiras, de los cuales podrían adquirir la infección si quiera incidentalmente. En efecto, los especímenes de *R. norvegicus* que infestan los citados mercados durante el día se ocultan en los desagües inmediatos, de donde salen tan sólo por las noches en busca de alimento. Dadas estas condiciones es de suponer no tengan necesidad de alejarse mucho, constituyendo así una población que carece de contacto con otros animales.

5. *Posible explicación del bajo título de los anticuerpos.* Es sabido que en el *R. norvegicus* los anticuerpos de la *L. icterohaemorrhagiae* suelen ofrecer ciertas particularidades. Así, además de no presen-

tar corrientemente títulos elevados, se ha verificado que las reacciones serológicas en algunos casos suelen tornarse negativas no obstante de que el animal sigue eliminando leptospiras por la orina (Ruys et al., 1948). Teniendo en cuenta esto, tal vez se podría explicar el que en los estudios efectuados por nosotros el cultivo del riñón haya ofrecido resultados notablemente superiores al de la reacción serológica. Sin embargo, parecería que hay también algún otro factor que interviene. En efecto, al realizar una serie de reacciones de aglutinación-lisis en 418 sueros, reacciones en las que se utilizó como antígeno simultáneamente cultivos de dos cepas aisladas de ratas por los autores (R23, en 346 casos; y, R410, en los 72 restantes) y de la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, con las cepas peruanas se obtuvo 215 (51.4%) positivas y tan sólo 123 (29.4%) con la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg (cuadro VI). Es interesante hacer notar que, considerando en conjunto los resultados obtenidos con ambos antígenos, el número total de sueros positivos fue 217, de los cuales solamente dos (1%) fueron negativos frente a las cepas peruanas, entretanto que con la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg ascendieron a 94 (43.3%) los negativos. Además, con este último antígeno los sueros reaccionaron en su mayoría a diluciones inferiores, como se puede apreciar en el cuadro VI. Conviene indicar también que entre los sueros positivos a ambos antígenos, con frecuencia se observó diferencias de dos a tres diluciones en los respectivos títulos. Por ejemplo, algunos sueros que reaccionaran con las cepas peruanas a dilución de 1:3,000 con la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg lo hicieron tan sólo a 1:100*.

* También se observó cierta diferencia entre las dos cepas peruanas empleadas, siendo la R410 la que ofreció títulos más altos.

CUADRO VI.— *Distribución del título obtenido en una serie de 418 muestras de suero, en la que se empleó simultáneamente como antígeno dos cepas peruanas (R23 y R410) y la L. icterohaemorrhagiae AB Wijnberg*

Dilución de los sueros	Distribución del título en las reacciones positivas			
	<i>L. icterohae. AB. Wijnberg</i>		Cepas peruanas (R23 y R410)	
	Posi- tivos	Porcentaje en rela- ción al N° de posit.	Posi- tivos	Porcentaje en relación al N° de positivos
1:100	53	43.1 %	70	32.6 %
1:300	52	42.3 „	76	35.3 „
1:1,000	10	8.1 „	48	22.3 „
1:3,000	8	6.5 „	18	8.4 „
1:10,000			2	0.9 „
1:30,000			1	0.5 „
Total			215	
positivos *	123			
Porcentaje en relación al total de muestras usadas (418)		29.4 „		51.4 „

* Considerando en conjunto los resultados obtenidos con las dos cepas peruanas y la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg fueron 217 los sueros positivos. De éstos tan sólo dos (1%) no reaccionaron con las cepas peruanas, entretanto que ascendieron a 94 (43.3%) los negativos con la *L. icterohaemorrhagiae* AB. Wijnberg.

6. *Ratas con hemocultivo positivo y reacción serológica negativa.*
Es difícil interpretar los resultados que las ratas con hemocultivo positivo ofrecieran frente a la reacción serológica. Pues, como se indica a continuación, ninguna de estas siete ratas mostró en la sangre anticuerpos a título de 1:100 o mayor:

Rata N°	Hemo- cultivo	Cultivo riñón	Campo oscuro	Reacción serológica
130	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.
261	"	Neg.	"	"
267	"	Pos.	"	"
501	"	"	Pos.	"
561	"	"	Neg.	"
578	"	Neg.	"	"
581	"	"	"	"

En el suero de cinco de las siete ratas anteriores, la reacción de aglutinación-lisis se realizó usando simultáneamente las cepas R410 y *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, siendo los resultados negativos para ambas cepas. A dilución de 1:10 (considerado como negativo el respectivo suero, de acuerdo con el criterio adoptado en esta publicación) reaccionaron tres sueros frente a R410 y dos a *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg. Por otro lado, fueron identificadas como *L. icterohaemorrhagiae* seis de las cepas aisladas, entretanto que la séptima se perdió antes de su identificación. Como cuatro ratas ofrecieran cultivos positivos simultáneamente de la sangre y el riñón, en la identificación de las respectivas cepas se eligieron dos de cada procedencia.

Desde que en las ratas con hemocultivo positivo la reacción de aglutinación-lisis resultara negativa también con la cepa peruana, hay que aceptar que dichos animales carecían de anticuerpos a título apreciable en el momento de ser autopsiados. Esto parecería inexplicable si se tiene en cuenta que cuatro de tales ratas —a juzgar por los correspondientes cultivos— ya albergaban leptospiras en el riñón, lo que indicaría que en tales casos no se trataba de infecciones tan recientes que no hubo tiempo suficiente para la formación de anticuerpos.

SUMARIO

Entre mayo de 1955 y diciembre de 1957 se ha estudiado la incidencia de la leptospirosis en las ratas (*Rattus norvegicus*) que infestan los mercados de abastos en la ciudad de Lima, tratando al mismo tiempo de determinar el valor diagnóstico de cada uno de los métodos empleados. En tales estudios se utilizaron 600 ratas, en la mayoría de las

cuales se efectuaron hemocultivos, cultivos del riñón, reacciones serológicas de aglutinación-lisis y observaciones al campo oscuro del triturado de riñón. Al determinar la presencia de anticuerpos en la sangre de las ratas así como en la identificación de las cepas que se aislaron en cultivo, se emplearon las siguientes cepas serológicas de leptospiras: *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, *L. canicola* Ruebush, *L. autumnalis* AB Akiyama A., *L. bataviae* Van Tienen, *L. sejroe* Mellersdorf, *L. pomona* S91, *L. ballum* S102, *L. hyos*, *L. grippotyphosa* Moscow V., *L. hebdomadis* y *L. pyrogenes* Salinem. Además, con frecuencia se usó también dos cepas (R23 y R410) aisladas por los autores durante las investigaciones e identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*. Los principales resultados obtenidos son los siguientes:

1. Los hemocultivos fueron positivos en el 1.2%, entretanto que los cultivos del riñón ofrecieron una positividad de 49.0%, variando entre 38.3 y 54.5% de acuerdo con los diferentes mercados donde fueran capturadas las ratas. La observación al campo oscuro del triturado del riñón fue positiva en el 26.0% de los casos. De acuerdo con la reacción de aglutinación-lisis, los sueros fueron positivos en el 32.8%. En 591 ratas, en las que se realizaran los estudios empleando los cuatro métodos de diagnóstico mencionados, la positividad fue de 62.4%.

2. La reacción de aglutinación-lisis fue positiva en 195 sueros, 167 (85.6%) de los cuales reaccionaron únicamente con el antígeno de *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg; seis sueros también reaccionaron tan sólo con un antígeno, pero diferente al anterior, entretanto que 22 mostraron reacciones cruzadas con dos o tres antígenos diferentes. De 19 de estas 28 ratas se logró aislar en cultivo las respectivas cepas de leptospiras, de las cuales 16 fueron identificadas, todas como *L. icterohaemorrhagiae*.

3. Los anticuerpos para *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg presentes en los sueros positivos ofrecieron títulos relativamente bajos, siendo 1:3,000 la mayor dilución a la que reaccionaran. El 88.7% mostraron aglutinación o/y lisis a diluciones entre 1:100 y 1:300. Sin embargo, en una serie comparativa de 418 sueros, en los que simultáneamente se empleó como antígeno la *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg y dos cepas (R23 y R410) aisladas de ratas e identificadas como *L. icterohaemorrhagiae*, con éstas se obtuvo mayor positividad al mismo tiempo que títulos más altos.

4. Siete ratas con hemocultivo positivo ofrecieron reacción de aglutinación-lysis negativa, aún usando como antígeno las cepas peruanas.

5. Se aislaron en cultivo 285 cepas de leptospiras, de las cuales se identificaron 203, correspondiendo todas a la *L. icterohaemorrhagiae*.

SUMMARY

From May, 1955, to December, 1957, the authors investigated the incidence of leptospirosis in 600 sewer rats (*Rattus norvegicus*) captured in the markets of Lima. A comparison was also made of the various standard methods for laboratory diagnosis. The following strains of leptospira were used for serological identification of cultural isolates, as well as for determining antibodies in the rat sera: *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, *L. canicola* Ruebush, *L. autumnalis* AB Akiyama A, *L. bataviae* Van tinnen, *L. sejroe* Mallersdorf, *L. pomona* S91, *L. ballum* S102, *L. hyos*, *L. grippotyphosa* Moscow V, *L. hebdomadis*, y *L. pyrogenes* Salinem (Strains R23 and R410, isolated by the authors from rats were also included).

Using four different laboratory methods of diagnosis, results were as follows:

1. Blood cultures were positive in only 1.2% of the specimens, kidney cultures were positive 49% of the time (varying from 38.3 to 54.5% from different markets); dark field examinations of kidney tissue revealed leptospiras in 26% of the rats, and the agglutination-lysis test was positive in 32.8% of serum specimens. When all four techniques were used, positive diagnosis was obtained in 62.4% of 591 rat specimens.

2. The agglutination-lysis test was positive in 195 sera, of which 167 (85.6%) reacted only with *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg, whereas six reacted with only one of the other strains; cross-reaction with two or three antigens were obtained with 22 sera. From 19 of these 28 rats, strains of leptospira have been isolated, 16 of which were identified as *L. icterohaemorrhagiae*.

3. The titers of the antibodies against *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg were relatively low, ranged from: 1:100 to 1:300 in 88.7% of the cases. The highest positive titer obtained was 1:3000. However, in 418 sera in which *L. icterohaemorrhagiae* AB Wijnberg and R23 and R410 were used as antigens, the titers were higher with the Peruvian strains.

4. Seven rats with positive blood culture showed negative agglutination-lysis tests (also with the Peruvian strains).

5. In total, 285 leptospiral isolates were made. By means of antisera against the 11 serotypes mentioned above, 203 were identified all as *L. icterohaemorrhagiae*.

RECONOCIMIENTOS

Las ratas utilizadas en los estudios cuyos resultados se ofrecen en esta publicación, con toda regularidad fueron proporcionadas por el Departamento de Epidemiología, División de Enfermedades Transmisibles, del Ministerio de Salud Pública. Por esta razón expresamos nuestros agradecimientos al doctor Joaquin Cornejo Ubilluz, Jefe del citado Departamento de Epidemiología. De manera especial nuestros reconocimientos al doctor Alfred S. Lazarus, Director del Instituto Nacional de Salud entre 1955 y 1957, por la comprensión y ayuda que nos dispensara durante nuestras investigaciones.

REFERENCIAS

- ARCE, J., y RIBEYRO, R. E.
1917 Sobre un caso de espiroquetosis ictero-hemorrágica. *Crón. méd.*, Lima, 34: 355-360.
- AYULO, V. M., y DAMMERT, Olga.
1947 Incidencia de la infestación con *Leptospira icterohaemorrhagiae* en las ratas grises (*Mus norvegicus*) de la ciudad de Lima. *Rev. Med. exp.*, Lima, 6: 94-107.
- CUADRA, M. C.
1955 Sobre siete casos de enfermedad de Weil en Lima. *Rev. méd. peruana*, Lima, 26: 121-158.
- GUIDA, V. O.
1950 Identificao serológica de leptospiras e pesquisa de anticorpos en ratos (*R. norvegicus*) capturados na cidade de Sao Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, 19: 85-92.
- HERRER, A., LICERAS, Julia, y MENESES, O.
1958 Leptospirosis en el Perú. I. Identificación de las cepas de leptospiras presentes en el perro y el gato e incidencia de la infección. *Rev. Med. exp.* Lima, 12: 65-86.
- LANGWORTHY, Virginia, y MOORE, Anna, C.
1927 A study of *Leptospira icterohaemorrhagiae*. *J. Infect. Dis.*, 41: 70-91.
- LARSON, C. L.
1943 Leptospirosis in rats (*R. norvegicus*) in and about Washington, D. C. An evaluation of the methods used for diagnosis. *Publ. Health Rep.*, 58: 949-955.

- RIBEYRO, R. E.
1918 Espiroquete icterohemorrágica en las ratas de Lima. *Crón. méd.*, Lima, 35: 157-159.
- RISLAKKY, V., y SALMINEN, A.
1955 Investigations of leptospirosis in rats in Finland. *Acta path. microbiol. scand.*, 37: 121-131.
- ROGGERO, P.
1946 La leptospirosis icterígena. *Rev. San. policía*, Lima, 7: 7-27.
- RUYS, Charlotte A., MINKENHOF, J. E., y WOLFF, J. W.
1948 Significance of immunological differences in leptospiras in the diagnosis and epidemiology of human leptospirosis. *Proc. 4th. Intern. Congr. trop. Med. Mal.*, 1: 337-344.
- SAVINO, E., y ANCHEZAR, B.
1942 Presencia de leptospiras en las ratas grises de Buenos Aires. *Rev. Inst. Bact. "Carlos G. Malbran"*, 11: 135-138.
- THIEL, P. H. VAN.
1948 The Leptospiroses. Universitaire Pers Leiden, Leiden.
- WOLFF, J. W.
1954 Laboratory diagnosis of leptospirosis. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Illinois.