

Consideraciones sobre la etiología de la enfermedad de Hansen

Dres. Alexis Ilukevich ¹
Ennio Ferreira ²
César Barroso ³
y Romer Fernández ⁴

INTRODUCCION

Desde que el médico noruego Gerhard Armauer Hansen²⁰ en 1871 ó 1874 señala por primera vez a un bacilo como agente infeccioso de la Lepra, un gran número de investigadores en todos los continentes se han dedicado al estudio de sus particularidades bacteriológicas. Hansen lo denomina *Bacillus Leprae* y Lehman y Neuman, posteriormente, lo clasifican como ***Mycobacterium leprae***^{26 32}.

1 Profesor de Enfermedades Infectocontagiosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

2 Profesor de Anatomía Patológica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Jefe del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Central de Maracaibo.

3 Médico Dermatopatólogo del Hospital Central de Maracaibo.

4 Médico Coordinador de los Servicios de Dermatología Sanitaria del Estado Zulia, Ministerio de Sanidad y Asistencia Social.

El hallazgo microscópico de este bacilo a nivel de la piel, mucosa o nervios es considerado como dato de suma importancia, no solamente para el diagnóstico de la enfermedad, sino también para la clasificación del caso.

Se admite casi generalmente que el bacilo es el causante de la enfermedad, debido a la presencia constante en el tejido patológico de los enfermos, especialmente en casos de la Lepra Lepromatosa y Lepra Dimorfa.

A partir de 1916, Kensuke Mitsuda divulga sus estudios inmunológicos con Lepromina que culminan con la aceptación de la Reacción de Mitsuda como prueba intradérmica fundamental en la inmunología de la enfermedad.

Por otra parte, ya en la época hanseniana se hace notorio que, a pesar de que los supuestos bacilos de lepra abundan con frecuencia en los tejidos del enfermo, éstos no se desarrollan "in vitro" y la enfermedad no puede ser transmitida a los animales de experimentación utilizando métodos y técnicas de rigor.

El investigador del ramo, por lo tanto, se encontraba en frente de un problema sumamente complejo cuando trataba de aportar pruebas de carácter etiológico. La ausencia de cultivo puro del supuesto agente infeccioso y el desconocimiento de una especie animal susceptible de la enfermedad imposibilitaron el cumplimiento de los Postulados de Koch, prueba irrevocable de la relación etiológica específica entre el bacilo y la enfermedad.

En los últimos años, sin embargo, varios autores han logrado aportar datos importantes, tanto en el campo de la trasmisión experimental de la enfermedad a los animales de laboratorio, como en la materia del cultivo de micobacterias a partir de lesiones específicas del enfermo, "in vivo" e "in vitro".

INOCULACION

Son muy significativas las experiencias de Shepard⁴⁶ quien, obtiene la adaptación progresiva del supuesto *M. Leprae* en los tejidos blandos de la planta podal del ratón blanco, logrando pases sucesivos mediante inoculación de muy pequeñas dosis bacilares ($5 \cdot 10^{-3}$). Una limitada multiplicación bacilar tiene lugar

en un alto porcentaje de los animales inoculados, sin embargo es restringida y el proceso no llega a la formación de lesiones macroscópicas. El microorganismo, según el autor mencionado, no se desarrolla en medios específicos para el cultivo de micobacterias y se comporta en la prueba de Mitsuda exactamente igual a **M. leprae**.

Por otra parte Bergel² observa un "aumento considerable del número de bacilos, perfectamente ácidosresistentes y homogéneos en el sitio de inyección (testículos) de ratas blancas, alimentadas con dietas pro-oxidantes. Bergel considera que dichas dietas inducen la susceptibilidad a la infección referida y afirma en 1971⁵ que "si la lepra está condicionada a la presencia del **M. leprae**, este bacilo sólo puede desarrollarse sobre un organismo ya previamente enfermo". Según Bergel, la lepra lepromatosa no puede reproducirse en animales de experimentación (tampoco en personas) que no padecen la enfermedad autooxidativa", cuyo desarrollo favorecen fundamentalmente, elementos nutritivos y metabólicos. La sustancia que se opone al establecimiento de la enfermedad autooxidativa, según Bergel es la vitamina E.

En algunas ratas alimentadas con dieta prooxidante, Bergel⁴ ha podido observar a los 20 meses de inoculación el establecimiento de "una verdadera infección lepromatosa con alteraciones neurales e infiltrados muy bacilíferos en almohadilla plantar". Dichos bacilos ácidosresistentes, sembrados en medios de Lowenstein-Jensen a distintas temperaturas no mostraron formación de colonias apreciables.

Binford^{6,7} describe nódulos granulomatosos en las orejas de hamsters (**Cricetus auratus**) inoculados por vía intradérmica con material procedente de enfermos lepromatosos.

Convit y colaboradores¹⁰⁻¹⁵ inocularon en varias oportunidades un gran número de animales, entre ellos más de 1.500 hamsters, ratas, acures, ratones negros y blancos, conejos y 12 cerdos. El material para inoculación fue seleccionado, según su proveniencia, de diferentes formas de lepra: Tuberculoide-reaccional, Lepromatosa, Borderline e indeterminada. No se hizo preparación alguna del sitio de inoculación, ni se usó cortisona, ni irradiaciones para bajar la resistencia del animal. Dichas experiencias

demonstraron que el material obtenido de lesiones Borderline proporcionaba muchos más casos positivos para el granuloma experimental que el obtenido de las lesiones lepromatosas, sin embargo, sólo un reducido número de enfermos facilitaba inóculos infectantes y estos últimos resultaban patógenos sólo para algunos hamsters de cada grupo de los animales inoculados. La lesión inicial aparecía en el pabellón de la oreja a los 5 a 9 meses de inoculación, en forma de un nódulo de estructura lepromatosa que contenía gran cantidad de bacilos alcohol-ácido-resistentes sueltos o agrupados en acúmulos muy parecidos a "Globi".

Después de varios pases de hamsters a hamsters, la infección se potencializaba y en varios casos se formaban focos a distancia, en el bazo, hígado u otros órganos internos.

A partir del tercer pase de hamsters a hamsters, se obtuvieron también nódulos en la oreja y almohadilla plantar del ratón blanco.

Las inoculaciones de control en conejos, acures y pollos revelaron la naturaleza no tuberculosa del inóculo en cuestión.

Un estudio con el microscopio electrónico realizado por Imaeda y colaboradores²⁹ demostró que la estructura submicroscópica del nódulo producido en la oreja del hamster, tiene cierta semejanza con la lesión lepromatosa humana, sin embargo, los nervios cutáneos del animal inoculado no despliegan lesiones apreciables a pesar de la invasión bacteriana masiva.

El cultivo de las lesiones mencionadas en el medio de Lowenstein-Jensen reveló una diferencia entre las lesiones provocadas por inoculación del material Borderline con las provocadas por el material lepromatoso. En las primeras no se pudo obtener cultivo de bacilos acidorresistentes, salvo después de numerosos pases sucesivos en hamsters, en tanto que en las lesiones provocadas por el material lepromatoso se cultivó micobacterias de manera sistemática desde su inicial pase en el animal.

Un antígeno preparado de la lesión bacilífera del hamster dio reacción cutánea positiva en enfermos lepromatosos, hecho contrario a la acción de la lepromina clásica, sin embargo, cuando se aplicó la lepromina, simultánea o posteriormente al anti-

geno del hamster, los enfermos lepromatosos (LL) reaccionaban positivamente a los dos antígenos ensayados.

Waters y Niven⁵⁵ experimentando con 48 hamsters, concluyen que "un tipo de infección multiplicada limitada ha sido conseguida en la oreja del hamster, pero no en los testículos, análogo al descrito por Shepard en la planta del ratón".

Ultimamente Rees⁴⁴ inoculando bacilos, obtenidos de enfermos con Lepra Lepromatosa, en ratones blancos timectomizados e irradiados (con dosis de 900R), es decir inmunológicamente deficientes, logra producir una multiplicación generalizada del supuesto **M. leprae** en el tejido de estos animales.

Los ratones inoculados en dichas condiciones presentan a los 6 a 8 meses lesiones de estructura lepromatosa con afección de los nervios periféricos. Según Rees, estos bacilos no son cultivables "in vitro".

De la revisión precedente de las más recientes experiencias de transmisión experimental de la Lepra se destaca el hecho de que existe una disociación de los resultados obtenidos por diferentes autores y los cuales podemos resumir de modo siguiente:

Los experimentadores de la escuela de Shepard y Rees consideran que el metabolismo del **M. leprae** parece ser similar al de otras micobacterias en virtud de que su multiplicación en la almohadilla plantar del ratón responde a la acción bacteriostática y hasta a la acción bactericida de determinadas drogas⁴⁷. No obstante, el desarrollo del germen en el tejido del ratón no tratado con dichas drogas, en todos los casos es limitado. Este microorganismo, que se multiplica en la planta del ratón inoculado, no se cultiva "in vitro", hecho que según los autores mencionados constituye una importante prueba de su identidad con el genuino **M. leprae**.

Bergel³ opina que "...si durante el curso de la inoculación los cultivos demuestran el desarrollo de colonias de bacilos acidorresistentes por contaminación del inóculo u otra causa, deben desecharse todos los animales inoculados, ya sabiendo que no se trata de **M. leprae**".

Binford⁷, sin embargo, obtiene en hamsters inoculados lesiones específicas con presencia de bacilos ácidosresistentes cultivables en el medio de Lowenstein-Jensen. Binford concluye que en sus hallazgos se trata de un microorganismo distinto de **M. leprae**, o bien de un mutante del mismo y, lo clasifica como bacilo no-fotocromógeno, es decir, perteneciente al grupo III de Runyon.

Convit y colaboradores^{13 14}, como lo hemos mencionado anteriormente, no logran cultivar "in vitro" micobacterias a partir de los nódulos producidos en las orejas de hamsters mediante inoculación de material Borderlaine. A pesar de eso, en investigaciones posteriores y después de muchos pases de la lesión mencionada de hamster a hamster sí se obtienen cultivos positivos para bacilos alcohol-ácido-resistentes en el medio de Lowenstein-Jensen. Estos bacilos resultaron idénticos a los cultivados "in vitro" a partir de lesiones causadas por la inoculación de material lepromatoso y clasificados como micobacterias no-fotocromógenas.

Los autores mencionados llegan a la conclusión de que los bacilos de las lesiones Borderlaine son genéticamente inestables y por lo tanto capaces de formar cepas adaptables al ambiente intracelular de otra especie (hamster).

CULTIVO.

A pesar de los múltiples fracasos en obtener el desarrollo del **M. Leprae** en medios artificiales, desde hace unos cincuenta años aparecen noticias sobre cultivos positivos para bacilos ácidosresistentes, logrados esporádicamente a partir de lepromas u otro material bacilífero tomado de enfermos de lepra.

Los medios de cultivo más usados en dichas investigaciones fueron los terrenos aptos para el cultivo de bacilo de Koch, sin embargo, en otras oportunidades se ensayó un gran número de medios de diferente composición.

Según Carpenter y Naylor⁹, numerosos bacteriólogos reportaron el haber cultivado "in vitro" una o varias bacterias a partir de pacientes leprosos. Entre los microorganismos descritos figuran bacterias differoides, bacilos anaerobios esporulados y cepas de bacterias alcohol-ácido-resistentes. Estas últimas son muy nu-

merasas y entre ellas se destacan formas cromógenas aisladas por Rost, Clegg, Duval, de Souza-Araujo, McCoy, Henderson, Ota y Sato, y formas no cromógenas cultivadas por Weil, Marchoux, Mc Coy, Duval, De Souza-Araujo y otros investigadores.

Las micobacterias mencionadas poseían una pronunciada capacidad de desarrollo en los medios de Dorset, Petragani, Petroff o Lowenstein-Jensen, formando colonias convexas, progresivas y recultivables, sin embargo, su aislamiento primario, como ya lo hemos mencionado, fue esporádico.

Fue el investigador brasileño de Souza-Araujo⁵¹⁻⁵⁴, quien logró demostrar que las cepas cultivadas de lesiones leprosas, son capaces de producir en ratones, ratas y macacos Rhesus, lesiones de estructura lepromatosa, en el sitio de inoculación.

El test de Mitsuda realizado con el antígeno preparado a base de dichos bacilos fue siempre positivo en pacientes lepromatosos y por lo tanto no se mostraba apto para su clasificación, pero desempeñaba cierta acción inmunizante.

La histopatología de la lesión humana experimental revelaba un granuloma con células epitelioides y gigantes de tipo Langhans.

De Souza-Araujo consideró que la inoculación repetida de dichos bacilos, vivos o muertos por el calor, al principio causa reacciones locales y generalizadas fuertes, pero con el tiempo se hace notorio el efecto inmunológico y curativo contra la lepra⁵⁴.

Soule⁴⁹ comunica sobre proliferación del supuesto **Mycobacterium leprae** en un medio preparado a base de embriones de pollo e incubado en una atmósfera al 40% de oxígeno y al 10% de dióxido de carbono. Los 42 especímenes ensayados proporcionaron en 25 oportunidades una limitada multiplicación de bacilos ácidosresistentes no-cromógenos. Los intentos de subcultivar los bacilos mencionados en los medios de Petragani o de Lowenstein-Jensen resultaron en todos los casos infructuosos.

Ilukevich y Convit^{24, 25} sembraron en el medio de Lowenstein-Jensen un gran número de muestras procedentes de lesiones le-

prosas no abiertas con el propósito de averiguar la frecuencia de cultivos positivos para micobacterias en los distintos tipos y grupos de la enfermedad. La incubación se efectuó a la temperatura de los 33°C con los siguientes resultados:

En el grupo de los 122 pacientes lepromatosos 19 proporcionaron cultivos positivos para micobacterias, o sea un 16 por ciento de los examinados.

De los 92 enfermos de lepra dimorfa y de los 36 de lepra tuberculoide se obtuvo un cultivo positivo para bacilos ácidosresistentes en cada grupo mencionado; los 12 pacientes con lepra indeterminada todos resultaron negativos para los cultivos en cuestión.

Según el esquema propuesto por Runyon las cepas de bacilos cultivados fueron agrupadas del modo siguiente:

Grupo 1 (Fotocromógenas)	2 Cepas.
Grupo 2 (Escotocromógenas)	16 Cepas.
Grupo 3 (No-fotocromógenas)	6 Cepas.
Grupo 4 (De crecimiento rápido)	Ninguna.

Las cepas catalogadas como pertenecientes al grupo III de Runyon (no-fotocromógenas) se revelaron como las de mayor poder patógeno, provocando nódulos bacilíferos de evolución lenta y progresiva en las orejas de hamsters y lesiones testiculares en ratas blancas.

Nosotros²⁷ hemos aislado en cultivo una micobacteria a partir de material procedente de un ganglio linfático, correspondiente a un caso de adenitis leprosa, en un enfermo con lepra lepromatosa reaccional. Exhaustiva clasificación de esta micobacteria (Cepa "Zulia 1"), reveló su identidad con las bacterias descritas anteriormente, perteneciendo al grupo III de Runyon.

Según la prueba de desamidación específica de Boenicke, las bacterias de la Cepa "Zulia 1" fermentan la Nicotinamida y Piracinaamida solamente, es decir se portan enzimáticamente como micobacterias afines a las aviarias, las que por su parte pertenecen al Grupo III de Runyon.

Las micobacterias afines a las aviarias, como se supone, son variedades del **M. avium**, tales como las cepas de Battey, y **M. ulcerans**, agentes infecciosos que producen diferentes enfermedades pero que semejan en su actividad enzimática mencionada.

En cuanto, al poder patógeno de nuestra cepa para los animales de laboratorio, el testículo de la rata blanca y la almohadilla del ratón fueron los lugares más susceptibles para el desarrollo de la lesión artificial.

Los conejos, pollos y acures (*Cavia-porcella*) resultaron prácticamente refractarios para la infección, lo que junto con las particularidades citoquímicas (prueba de Konno, etc.), y las del cultivo, diferencian la cepa en cuestión de los bacilos de la tuberculosis.

Ilukevich^{21, 22} examinó sueros sanguíneos de un total de 21 enfermos de lepra, atendiendo su capacidad de aglutinación mediante el método de aglutinación rápida, con tres cepas de micobacterias cultivadas, a partir de lepromas humanos, en Löwestein-Jensen. Como comparación fueron examinados al mismo tiempo y con el mismo procedimiento otros 21 sueros sanguíneos de personas no leprosas (10 enfermos con tuberculosis pulmonar y 11 de otros enfermos de diferentes dermatosis), además fueron aplicados otros 3 antígenos; una cepa de **M. avium** y dos cepas cromógenas aisladas a partir de esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar.

Las reacciones de aglutinación mostraban que las micobacterias cultivadas a partir de tejido leproso provocaban aglutinaciones claramente positivas en 17 de 21 casos. Los restantes antígenos empleados como grupo control resultaban prácticamente inactivos.

En el grupo de los enfermos no hansenianos se pudo observar reacciones de seroaglutinación positivas sólo en 4 de un total de 21 casos examinados.

Podría suponerse que las cepas estudiadas presentan distintos tipos serológicos, pero que se encuentran relacionados biológicamente en los enfermos leprosos.

Por otra parte, Rao y colaboradores⁴³ realizaron investigaciones inmunológicas con el fin de determinar las particularidades antigénicas del **M. leprae** y luego compararlas con aquellas de una micobacteria cultivada "in vitro" por Bapat¹ a partir de nódulos lepromatosos, en un medio de cultivo celular libre de suero (cepa I.C.R.C.). Mediante inmunización de conejos fueron obtenidos antisueros, específicos para cada uno de los bacilos mencionados, cuyos anticuerpos reaccionaban solo con los componentes de suero sanguíneo humano. Los resultados de las investigaciones han indicado que el **M. leprae** y el bacilo cultivable (I.C.R.C.), dieron idénticos resultados en los experimentos inmunológicos.

En investigaciones más recientes, Boenicke⁸ utilizó para el cultivo "in vitro" de **M. leprae**, tubos especiales en forma de dos cuernos, con separación de los extremos opuestos mediante una lámina porosa (filtro) de cristal aglutinado. Ambas partes del tubo contenían el medio de cultivo líquido, una de las cuales servía para el desarrollo de la siembra, y la otra servía para la progresiva sustitución del medio durante el período de incubación.

A los 9 a 12 meses se observó una multiplicación limitada del **M. leprae** en un 15.8 por ciento de los cultivos. La temperatura óptima para el crecimiento fue de 32°C a 33°C.

Al comparar dichos resultados con los obtenidos anteriormente por uno de nosotros²³ al cultivar el material lepromatoso en el medio de Lowenstein-Jensen, se destaca la igualdad casi completa en cuanto al porcentaje de los cultivos positivos para bacilos alcohol-acidorresistentes, señalado en ambos trabajos (15.8% y 16% respectivamente). Además coinciden los datos sobre la temperatura óptima requerida para el crecimiento de los gérmenes en cuestión (32°C a 33°C y 30°C a 35°C respectivamente) y lo que es más significativo, las micobacterias de Boenicke y las cultivadas por nosotros se portaban en la prueba enzimática de desamidación, prácticamente, de manera semejante, es decir, como pertenecientes al grupo de micobacterias afines a las aviarias. Por lo tanto creemos que es conveniente ensayar la acción de la tuberculina de origen aviar en los enfermos de lepra.

Murohashi y Yoshida³⁶ emplearon para los intentos de cultivar el **M. leprae** un medio semisintético de agar blando al 0,1 por ciento, de diversa composición básica.

Después de 20 semanas a 1 año de incubación a la temperatura de los 37°C, en el medio se formaron unos micro-acúmulos de bacilos fuertemente ácidosresistentes y semejantes a colonias de dimensión diminuta. Lepromina preparada a base de dichos microorganismos indujo en los enfermos de lepra la misma reacción que el antígeno de Dharmendra.

Los autores mencionados lograron obtener varios subcultivos a partir del cultivo inicial.

En este lugar merece recordarse que Santiago Américo Freire¹⁸ ya hace unos 16 años utilizaba en sus intentos de cultivar el **M. leprae**, un medio compuesto de agar líquido al 0.1 por ciento (en el medio sintético de Kirchner) con una base de suero (o plasma) procedente de un enfermo lepromatoso (20%).

Freire menciona los 5 aislamientos verificados.

Olitzki y colaboradores^{39, 40, 41}, lograron mantener "in vitro" durante ocho repiques subsiguientes, el supuesto **M. leprae** en un medio de Eagle enriquecido por el extracto de micobacterias saprófitas (medio de Olitzki y Gershon).

Existe además un considerable número de trabajos experimentales realizados con la finalidad de dilucidar la naturaleza del agente infeccioso de la lepra. Así Chang¹⁶, Devignat¹⁷ y Ranadive⁴², para mencionar solo algunos, han observado una limitada multiplicación del **M. leprae** en el citoplasma de ciertas células cultivadas "in vitro" (macrófagos, células tumorales, etc.).

Gay Prieto y colaboradores¹⁹, inoculando material procedente de lesiones de diferentes tipos de lepra en la membrana Corio-alantoidea del embrión de pollo de 12 días, encontraron ya a las 48 de la inoculación, lesiones nodulares macroscópicamente visibles en la membrana mencionada.

Investigación histológica de estas lesiones revelaba un granuloma incluyendo células espumosas; su estudio con el microscopio electrónico permita ver células vacuoladas con citolismas

y algunas formas globulares y cuerpos esféricos. La re-inoculación de este material patológico de huevo a huevo permitía la reproducción de las lesiones en serie.

El inóculo pasado por el filtro de Mendel producía lesiones macroscópicas y microscópicas similares a las obtenidas por inoculación directa de material procedente de lepra humana.

Una multiplicación bacilar en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo no fue observada, sin embargo, los autores mencionados anotaron la presencia de pequeñas partículas, interpretadas por ellos como variaciones morfológicas de las formas del *M. leprae*, quizás estados del ciclo "L".

COMENTARIOS.

De lo expuesto se desprende que los resultados obtenidos por diferentes autores, tanto en experimentos de trasmisión de la lepra humana a los animales de laboratorio, como en los ensayos para obtener cultivos "in vitro" de *M. leprae*, se polarizan prácticamente en dos tipos de respuestas diferentes.

En cuanto a la trasmisión experimental, una de estas respuestas se manifiesta por la multiplicación limitada de bacilos alcohol-ácido-resistentes en el sitio de inoculación^{46 48 37 55} particularmente en fibras musculares estriadas y luego en las células perineurales y células de Schwann⁵⁶. Dicho proceso jamás lleva a la aparición de lesiones macroscópicamente visibles, por lo menos en animales, cuya resistencia natural no fue disminuida artificialmente. Los bacilos proliferados en el tejido animal no se cultivan "in vitro", hecho que hace prácticamente imposible la clasificación de estos microorganismos.

El otro tipo de la respuesta del animal a la inoculación de material tomado de enfermos de lepra se caracteriza por la aparición de lesiones nodulares, visibles y palpables, en el sitio de la inyección^{6 13 51}.

Estas lesiones histológicamente recuerdan granuloma leproso humano y contienen un gran número de bacilos alcohol-ácido-resistentes cultivables^{7 14 54}.

Ahora, en cuanto a los intentos de obtener el cultivo de **M. leprae** "in vitro", los resultados considerados, aquí como positivos, obedecen también a dos formas diferentes de la proliferación bacilar.

Autores como Soule y colaboradores^{49 50}, Boenicke⁸, Olitzki y colaboradores^{39 40 41}, Murohashi y Yoshida³⁶, describen haber observado en un relativamente alto porcentaje de los casos ensayados, una limitada multiplicación de los bacilos sembrados, sin formación de colonias apreciables, en los medios de cultivo empleados. Esta forma de proliferación bacilar nos parece algo similar a la que tiene lugar en la almohadilla plantar del ratón inoculado con **M. leprae**.

Por otra parte, las bacterias alcohol-ácido-resistentes cultivadas a partir del material procedente de enfermos de lepra por de Souza-Araujo^{51, 53, 54}, Ilukevich^{23, 25}, Lu Huynh y colaboradores³³ y otros^{1, 27, 34}, se desarrollan en el medio de cultivo en forma de colonias cromógenas o no cromógenas progresivas, que con relativa facilidad proporcionan subcultivos viables. Una gran parte de estas cepas²³, como ya lo hemos mencionado, producen lesiones experimentales semejantes en su estructura histopatológica, como las obtenidas por de Souza-Araujo⁵², Binford⁶ y Convit y colaboradores¹³ en sus ensayos de la transmisión de la lepra humana a los animales de laboratorio.

Sin embargo, hasta el momento, no se han logrado crear condiciones experimentales favorables para que sean cumplidas las exigencias de Koch (Postulados de Koch) relacionados con la identificación del agente infeccioso de la lepra humana. En consecuencia no existe todavía un modelo taxonómico del genuino **M. leprae**, hecho que dificulta poderosamente la clasificación "in vitro" e "in vivo" de los bacilos cultivados a partir de lesiones leprosas y sospechosos de ser el agente en cuestión.

El problema de la identificación del **M. leprae** parece estar complicado por factores de naturaleza heterogénea, ya que los estudios realizados con el microscopio electrónico por Tamotsu Imaeda³⁰ y otros investigadores^{31 38} han permitido aclarar que el **M. leprae** es muy diferente en cuanto a su estructura celular en los tres tipos de lepra, lepromatosa, tuberculoide y dimorfa.

Shepard y colaboradores^{35 48} y Ress y Valentine⁴⁵ observaron que solamente los bacilos sólidos, es decir, homogéneamente teñidos representan las formas viables del **M. leprae** y que los no teñidos completa y uniformemente constituyen el contingente de los gérmenes no viables.

Es muy peculiar la localización del **M. leprae** en el tejido de los afectados por la lepra lepromatosa, lepra dimorfa o lepra tuberculoide.

En las primeras dos formas de la enfermedad los bacilos son muy abundantes y suelen observarse dentro de las células en agrupaciones características denominadas "globi", pero también se encuentran libres en los espacios linfáticos. En la lepra tuberculoide, por el contrario, el número de los bacilos es muy reducido y estos jamás aparecen en forma de "globi".

El polimorfismo mencionado del **M. leprae** permite sospechar que el germen posee un complejo ciclo de desarrollo, escalafonado en diversas etapas, a una de las cuales podrían pertenecer las micobacterias cultivadas "in vitro" a partir de lepromas humanos, o de los ganglios linfáticos afectados, como la Cepa "Zulia-1" en particular.

Refiriéndose a estos bacilos cultivables en el medio de Lowentein-Jensen, Binford⁷ y posteriormente Convit y colaboradores^{14 23} suponían que una nueva variante del **M. leprae** ha sido producida por mutación.

Pero dentro de la clasificación que fuese, lo cierto es que tenemos en la mano cepas de bacilos alcohol-ácido-resistentes y cultivables "in vitro" que:

1º— Producen alteraciones patológicas específicas localizadas en animales de laboratorio, ratas y ratones especialmente.

2º— Proporcionan con mucha frecuencia reacciones positivas de sero-aglutinación en enfermos de lepra, no así en los sueros de individuos no leprosos.

3º— Utilizados como antígenos, en aplicación intradérmica, provocan fuertes reacciones semejantes a las de las pruebas de Mitsuda y Fernández, no sólo en personas sanas y en pacientes

con lepra tuberculoide sino también en aquellos con lepra lepromatosa.

4°— El aspecto histopatológico de las lesiones cutáneas experimentales en el hombre, usando bacilos muertos, muestra granulomas epitelioides y gigantoceculares, testimonio de la acción inmunizante, o lo que es lo mismo, manifestación de la resistencia despertada por la inoculación, tal como fue interpretada por de Souza-Araujo.

5°— Inyectados a pacientes con lepra lepromatosa, simultánea o posteriormente a la lepromina clásica, originan reacciones positivas para ambos antígenos usados.

Creemos que el porvenir de la utilidad de nuestros bacilos radica en su posible uso en el diagnóstico serológico de la lepra, y en lo que vendría a ser la meta final de nuestras investigaciones, su aplicación como elemento de premunición o prevención de la Enfermedad de Hansen.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1 — BAPAT, C. V., Ranadive, K. J. and Khanolkar, V. R.: "In vitro" cultivation of an acid-fast mycobacterium isolated from human lepromatous leprosy. *Indian J. Path. a. Bact.*, 1:156-159; 1958 (referido según S. S. Rao: *Internat. J. Leprosy*, 32 (Nº 2): 103-116; 1964).
- 2 — BERGEL, M.: Inoculación del *Mycobacterium leprae* a ratas alimentadas con dietas pro-oxidantes. 1°— Resultados bacteriológicos hasta los 7 meses de la inoculación. *Semana méd.*, 111:480-489; 1959.
- 3 — BERGEL, M.: Transmisión experimental de la infección leprosa a animales de laboratorio. *Rev. lat.-amer. Microbiol. Parasitol.*, 8:159-170; 1966.
- 4 — BERGEL, M.: Lepra lepromatosa producida por inoculación de *M. leprae* en la almohadilla plantar de ratas con dietas pro-oxidantes. *Dermatolog. Tropica.*, 3:115, 1964.
- 5 — BERGEL, M.: Consideraciones sobre la patogenia, prevención y tratamiento de la lepra. *Rev. Leprológ.* Fontilles 8 (Nº 2): 173-196, 1971.
- 6 — 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. *Labor. Investig.*, 8:901-924, 1959.

- 7 — BINFORD, C. H.: Studies on a Mycobacterium Obtained from the Golden Hamster (*Cricetus auratus*) after Inoculation with Lepromatous Tissue. *Labor. Investig.*, 11:942-955, 1962.
- 8 — BOENICKE, R.: The presents state of growth of *M. leprae* under in vitro conditions. International Leprosy Colloquium, Borsstel, August 26 to 27, 1970. *Internat. J. Leprosy*, 39:(N° 2, 2ª parte), 1971.
- 9 — CARPENTER, C. M. and Naylor-Foote, A. W. C.: The Bacteriology of Leprosy. (Cochrane, R. G.: *Leprosy in Theory and Practice*, John Wright a. Sons LTD, Bristol, 1959, págs. 7-21).
- 10 — 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.
- 11 — CONVIT, J., Lapenta, P., Ilukevich, A. e Imaeda, T.: Inoculación experimental a los animales de laboratorio con *Mycobacterium leprae*. *Rev. Venezol. San. Asist. Soc.*, 26:388-389, 1961.
- 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, 2-8 de julio de 1961.
- 13 — CONVIT, J., Lapenta, P., Ilukevich, A. e Imaeda, T.: Experimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals. 1º— Clinical, Bacteriologic and Histopathologic Study. *Internat. J. Leprosy*, 30:239-253, 1962.
- 14 — CONVIT, J., Lapenta, P., Ilukevich, A., e Imaeda, T.: Experimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals - III. *Internat. J. Leprosy*, 32:136-149, 1964.
- 15 — CONVIT, J. e Ilukevich, A.: La posibilidad vital en el hamster de bacilos inoculados provenientes de formas Borderline y Lepromatosas. Segunda Reunión Anual de Dermatología, Hospital Univ. de Caracas, 24-25 de junio de 1966. Resúmenes, pág. 8.
- 16 — CHANG, Y. T.: Comunicación personal.
- 17 — DEVIGNAT, R.: Multiplication of Hansens bacillus in complex symbiosis in vitro. *Nature*, 190:832, 1961.
- 18 — FREIRE, S. A.: Methods of cultivation of the Hansen bacillus. Slide culture; Hemolysis tube culture; Direct inoculation of the liquid medium. *Internat. J. Leprosy*, 24:57, 1956.
- 19 — GAY PRIETO, J., Rubio Huertos, M. and Alonso Puertas, M. L.. Experiments on the Transmission of Human Leprosy to the Chorio-Allantoic Membrane of the Chicken. *Acta leprologica* (N° 23):5-17, 1965.

- 20 — HANSEN, G. A.: Undergelser Angaende Spedalskhedens Arsa-
ger Tidels Udfrte Sammen Med Forstander Hartwig. Norsk.
Magazin f. Laegevid, 4:1-88, 1874; reprinted in part (English
translation) in Internat. J. Leprosy, 23:307-309, 1955.
- 21 — ILUKEVICH, A.: Antigenic Properties of Some Mycobacterial
Strains Isolated and Cultivated From Leprosy Tissue. Internat.
J. Leprosy, 39:581-584, 1971.
- 22 — ILUKEVICH, A.: Características antigénicas de algunas cepas
de micobacterias cultivadas, procedentes de tejidos leproso-
sas. Pruebas de Aglutinación. Rev. de Leprología-Fontilles, 7:551-556,
1970.
- 23 — ILUKEVICH, A.: Sobre el aislamiento de micobacterias a partir
de pacientes leproso- sas. Particularidades bacteriológicas y el po-
der patógeno de las cepas cultivadas en medios artificiales.
Kasmera, 3:111-139, 1969.
- 24 — ILUKEVICH, A. und Convit, J.: Beitrag zur gelegentlichen
Züchtung von Mykobakterien aus menschlichen Lepromen und
zur Pathogenität dieser Stämme für Laboratoriumstiere. Inter-
nat. Colloquium über die Variabilität der Mykobakterien unter
experimentellen und klinischen Bedingungen. Borstel, 13 a 15
de octubre de 1965.
- 25 — ILUKEVICH, A. y Convit, J.: El cultivo de micobacterias a par-
tir de pacientes leproso- sas. Reunión Anual de Dermatología. Hos-
pital Univ. Caracas, 24 a 25 de junio de 1966.
- 26 — ILUKEVICH, A., Convit, J., Imaeda, T. y Lapenta, P.: Comen-
tarios sobre la situación de las micobacterias en la sistemática
actual. Rev. Venezol. San. Asist. Soc., 29:98-110, 1964.
- 27 — ILUKEVICH, A., Barroso, C. y Hómez, J.: Cultivo e inocula-
ción experimental de una micobacteria aislada de un caso de
lepra lepromatosa reaccional. V. Reunión Anual de Dermatolo-
gía. Hogar-Clinica San Rafael, Maracaibo, 19-24 de junio de
1969.
- 28 — ILUKEVICH, A.: Ensayos de seroaglutinación con micobacte-
rias cultivadas de pacientes hansenianos y llevadas en pases
por animales de laboratorio. Memorias del VIII Congreso Vene-
zolano de Ciencias Médicas, Vol. 1:585-591, 1971 (Maracaibo).
- 29 — IMAEDA, T., Convit, J., Ilukevich, A. and Lapenta, P.: Expe-
rimental Inoculation of Human Leprosy in Laboratory Animals.
II-Electron Microscope Study. Internat. J. Leprosy, 30:395-413,
1962.
- 30 — IMAEDA, T.: Posibilidades de obtención del cultivo del *Myco-
bacterium leprae*. Arch. Hosp. Vargas (Caracas), 3:331-338,
1961.

- 31 — IMAEDA, T. and Convit, J.: Electron microscope study of *Mycobacterium leprae* and its environment in a vesicular lepromatous lesion. *J. Bacteriol.* 83:43-52, 1962.
- 32 — LEHMANN y Neumann: *Mycobacterium leprae* en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 7^a Ed., 1957.
- 33 — LU HUYNH, Bourges, M. y Coudert, J.: Electron microscope study of cultivated mycobacterium from human lepromas.
- I— Morphological observations. *Bull. Soc. Pats. Exot.* 64:159-175, 1971.
- II— Remarks on certain special structures. *Idem*, 176-191, 1971. Referido según: *Rev. Leprología-Fontilles*, 8:619, 1972 (Resumen).
- 34 — MARIE-SUZANNE, Soeur, R. and Noel, R.: Etude comparative d'un Bacille acido-résistant isolé par Culture d'un Lépreux humain et du Bacille de Hansen. *Ann. Inst. Pasteur*, 81:238, 1951.
- 35 — McRAE, D. H. and Shepard, C. C.: Relationship between the staining quality of *M. leprae* and infectivity for mice. *Infection Immunity*, 3:116-120, 1971. (Tomado de *Rev. Leprología-Fontilles*, 8:629, 1972).
- 36 — MUROHASHI, T. and Yoshida, K.: Attempts to the cultivation of *M. leprae* in cell-free, semi-synthetic media. *International Leprosy Colloquium, Borstel, August 26 to 27, 1970. Internat. J. Leprosy*, 39:(Nº 2), 1971.
- 37 — NAKAMURA, K. and Hisai, S.: Experimental inoculation of *M. leprae* into the foot-pads of asiatic chipmunk (*Tamias sibirians*). *La Lepro*, 39:205, 1970 (tomado de *Rev. de Leprología-Fontilles*, 8 (Nº 5):655, 1972).
- 38 — NISHIURA, M.: The electron microscopic basis of the pathology of leprosy. *Internat. J. Leprosy*, 28:357-400, 1960.
- 39 — OLITZKI, A. L. and Codinger, D.: Studies on *Mycobacterium leprae* in Media Enriched by Mycobacterial Extracts. *Internat. J. Leprosy*, 35:154-165, 1967.
- 40 — OLITZKI, A. L., Godinger, D., Olitzki, Z. and Dorfman, M. L.: Microscopic, Cultural and Serologic Studies on *Mycobacterium leprae* and other Mycobacteria Isolated from Leprosy Patients. *Internat. J. Leprosy*, 35:166-174, 1967.
- 41 — OLITZKI, A. L. and Gershon, Z.: Maintenance of Cytopathic Activity of *Mycobacterium leprae* in Eagl's Medium Supplemented by Mycobacterial Extracts. *Israel J. Med. Sc.*, 1 (Nº 5): 1004-1008, 1965.
- 42 — RANADIVE, K. J., Bapat, C. V. and Khanolkar, V. R.: Studies of pathogenicity of the ICRD bacillus isolated from human lepromatous leprosy. *Internat. J. Leprosy*, 30:442-456, 1962.

- 43 — RAO, S. S., Nadkarni, J. S. and Khanolkar, V. R.: Immunologic studies with *Mycobacterium leprae* and an acid-Fast Mycobacterium cultivated from human leprosy nodules. *Internat. J. Leprosy*, 32:103-116, 1964.
- 44 — REES, J. W.: New perspectives for the study of leprosy in the laboratory. *Lepr. Rev.* 41:136-154, 1970.
- 45 — REES, R. J. W. and Valentine, R. G.: The appearance of dead leprosy bacilli by light and electron microscopy. *Internat. J. Leprosy*, 30:1-9, 1962.
- 46 — SHEPARD, C. C.: The Inoculation of Leprosy Bacilli into Mice by the Food-pad Route. Transactions Leonard Wood Memorial Johns Hopkins Univ. Symposim on Research in Leprosy, Baltimore, Md. pp. 247-255, 1961.
- 47 — SHEPARD, C. C.: Fuerther experience with the kinetik method for the study of drugs againts *M. leprae* in mice. Activities of DDS, DFD, Enthionamide, Capromycin and PAM 1.392. *Internat. J. Leprosy*, 37:389-397, 1969.
- 48 — SHEPARD, C. C. and McRae, D. H.: *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationnship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. *J. of Bacteriology*, 89:365, 1965.
- 49 — SOULE, M. H.: Cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Internat. J. Leprosy*, 32:195-197, 1964 (Reprinted article).
- 50 — SOULE, M. H. and McKinley, E. B.: Cultivation of *M. leprae* with experimental lesions in monkeys. *American J. Trop. Med.* 12:1-36, 1932.
- 51 — SOUZA Araujo, H. C. de: Case of acute malignant leprosy, with infection of the consort within three months of matrimonial life. Isolation from a cutaneous lesion of the same patient of an acid-fast bacillus (Chromogenic culture) pathologenic for rats, mice, macaus rhesus and Man. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 48:76-99, 1950.
- 52 — SOUZA Araujo, H. C. de and Gomes de Sã, J.: Ensayos sobre lepra experimental. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 49: 659-668, 1951.
- 53 — SOUZA Araujo, H. C. de: Experimental Leprosy in Monkeys. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 52:653-673, 1954.
- 54 — SOUZA Araujo, H. C. de: Experiments in inmunology of Leprosy by Means of inoculation of patients with Living and dead suspensions of acid-fast bacilli cultures. Departamento de Im-
prenta Nacional, Río de Janeiro, Brasil, 1959. (En portugués e inglés).

- 55 — WATERS, M. F. R. and Niven, J. S. F.: Experimental infection of the golden hamster with **Mycobacterium leprae**. Internat. J. Leprosy, 33:297-315, 1965.
- 56 — WEDDEL, A. G. M., Palmer, E. and Rees, R. J. W.: The fate of **M. leprae** in CBA mice. J. Path., 104:77-92, 1971.