

# Contribución al estudio de la verruga peruana

## II.—Cultivo de la *Bartonella bacilliformis*

POR TELÉMACO S. BATTISTINI

---

### MORFOLOGÍA

Ocupémonos primero del aspecto morfológico de este organismo en preparaciones coloreadas. El Giemsa, el Wright y el azul de toluidina, lítico de MACKENHIE son los únicos colorantes que permiten un exacto conocimiento estructural de la B. b. Frottis bien finos, fijados a temperatura de laboratorio, o con alcohol metílico, son coloreados con una solución de Giemsa por 10 o 15 minutos, lavados en un chorro fuerte de agua corriente que arrastra los precipitados que ocasionalmente se forman, sobre el magma amorfo del medio de cultivo, y se dejan secar al aire libre.

En preparados de cultivos jóvenes, coloreados de la manera indicada, se distinguen pequeñísimos y finos elementos, teñidos en rojo violáceo, con las siguientes formas fundamentales: ovoide, bacilar y diplococobacilar. La forma ovoide (elemento inicial de desarrollo), está constituida por un gránulo coloreado intensamente en rojo violáceo y que ocupa uno de sus polos, mientras el resto del plasma, formando un halo, se tiñe en azul pálido. La forma bacilar o en barra, (forma adulta), no revela detalle estructural, y se tiñe uniformemente en rojo

violáceo. Por último, la forma diplo-cocobacilar, representa la unión de dos elementos ovoides y a nuestro juicio es una forma de reproducción. Como hemos dicho, son estos los elementos morfológicos fundamentales, que al agruparse ofrecen las más variadas disposiciones y formas, las que en ningún caso, deben tomarse como tipo morfológico; esas bizarras agrupaciones son función del medio de cultivo, y de las condiciones culturales generales, temperatura, edad, etc., regla que se aplica a este organismo como a cualquier otro en general.

Así, por ejemplo, en los medios gelatinosos o semi-sólidos, se distinguen grandes masas, constituidas por sinnúmero de elementos finísimos, de aspecto cocoide, incluidos en una glea amorfa, y que al ojo poco acostumbrado dan la impresión de verdaderos cuerpos cocoides, siendo en realidad, una agrupación de elementos ovoides. Tiene importancia hacer resaltar este hecho, pues como veremos más adelante, los cuerpos verdaderamente cocoides, son formas degenerativas, propias de los cultivos viejos, o de medios inapropiados al desarrollo de este organismo.

Al lado de estas grandes masas, verdaderas colonias microscópicas, se distinguen las otras dos formas, barras o bastones y diplo-cocobacilares, aisladas o reunidas (más constante), formando palizadas de variable número de elementos.

En estado fresco y al examen en campo obscuro, aparecen con un doble contorno bien manifiesto, los mismos tipos morfológicos, e idénticas agrupaciones a las descritas en los preparados coloreados. Las dimensiones de la B. b. en cultivo, varían de 0.6u x 0.2u a 1.6u x 0.5u. No toma el Gram, y es fácilmente coloreable por los reactivos tintoriales generales.

La B. b. es motil, pero esta propiedad está en relación con el medio en que se desarrolla; así, en los medios semisólidos, carecen de ella, y en los medios sólidos, los organismos que se desarrollan al contacto de la zona del agua de condensación, manifiestan un grado de motilidad intenso. La motilidad es función de la edad del cultivo, en cultivos mayores de dos semanas, aun cuando las condiciones de humedad y temperatura sean óptimas, los organismos pierden este carácter.

La motilidad de este organismo debe estar condicionada a la existencia de órganos de movimiento (pestañas), nosotros no hemos llegado a demostrar su existencia; a este respecto conviene hacer notar, que en los cultivos viejos, al lado de las formas de-

generativas, se observan elementos espiralares, de dimensiones muy variables, 7 a 30 $\mu$ , y que constituyen según algunos bacteriologistas, formaciones derivadas de flagelos bacterianos.

Este organismo no produce esporas, ni tiene cápsula. Su método de reproducción es simple, binaria.

#### MÉTODOS DE CULTIVO — ASPECTOS CULTURALES

En medios constituidos por suero, plasma o sangre total (5-20%), más agar simple, de consistencia gelatinosa o sólida, la B. b. se cultiva fácilmente. El aspecto macroscópico de los cultivos, depende, tanto, de la cantidad de inoculum, cuanto, de la manera de practicar la siembra.

En los medios gelatinosos o semi-sólidos (0.05 a 0.2% de agar), la visibilidad macroscópica de desarrollo, en los cultivos originales, es función de la cantidad de sangre empleada; así, si nosotros sembramos más de 0.1cc, la opacidad de la mezcla sangre-medio de cultivo, hará imposible determinar macroscópicamente el desarrollo del germen. Si por el contrario sembramos 3 o 4 gotas de sangre, y mezclamos bien, en orden a distribuirla homogéneamente en la capa media superior del medio, a los 6 o 7 días de incubación (28° C), dos aspectos culturales pueden obtenerse: así la sangre es altamente parasitada (verruca, face hemática), observaremos una zona superficial de opacidad, de 5 a 8mm. de profundidad, y que representa la zona de activa multiplicación del organismo; b) si la sangre es tan poco parasitada que al examen microscópico es casi imposible determinar la presencia de la B. b. (verruca, face eruptiva), observaremos el desarrollo de colonias aisladas (puntiformes, con un ligero halo, o francamente estelares, que dan la impresión de colonias producidas por cierta clase de hongos), dispersas en una zona de 2 a 3 cm. de profundidad en el medio.

Los cultivos pasados por muchas generaciones y perfectamente adaptados al medio cultural, los dos aspectos macroscópicos de los cultivos originales a que hacemos referencia en el párrafo anterior, son fácilmente reproducibles; todo depende de la manera de mezclar el inoculum al medio de cultivo.

En los medios sólidos, a los 6 o 7 días, para los cultivos originales, o 3 a 4 días, para los cultivos ya acostumbrados, y a la temperatura de 28°/C, el desarrollo de este organismo se manifiesta por la presencia de finísimas colonias puntiformes ( el

aspecto más nítido se obtiene en medios con sangre total), blanquecinas, ligeramente elevadas sobre la superficie del medio; en los cultivos originales, es tan discreto el desarrollo, y tan finísimas las colonias, que es necesario muchas veces recurrir al examen microscópico para determinar la positividad o no, del cultivo.

En el cuadro adjunto damos la relación de los medios empleados por nosotros para el cultivo de este organismo.

#### MEDIOS DE CULTIVO

<i>Consistencia</i>	<i>Composición</i>	<i>Desarrollo</i>
A—Caldo corriente .	flúida	negativo
B—Agar corriente .	sólida	”
C—Suero (humano, conejo, caballo, mono) . . . . .		”
Solución salina o agua . . . . .		
Agar . . . . .		
Con o sin glucosa.	semi-sólida	positivo
D—Suero, con o sin azúcares . . . . .	flúida	negativo
E—Suero . . . . .		
Caldo corriente .		
Con o sin azúcares . . . . .	”	”
F—Suero . . . . .		
Solución salina .		
Con o sin azúcares . . . . .	”	”
G—Plasma oxalatado o citratado . . .		
Solución salina .		
Hemoglobina (humana) . . . . .	”	”
H—Caldo corriente .		
Emulsión cerebro (conejo) . .	”	”

<i>Consistencia</i>	<i>Composición</i>	<i>Desarrollo</i>
I—Caldo corriente . Suero . . . . .		
Emulsión cerebro.	"	"
J—Caldo corriente . Emulsión cerebro.		
Agar . . . . .	semi-sólida	"
K—Suero . . . . . Emulsión cerebro.		
Agar . . . . .		"
L—Ascitis . . . . . Caldo corriente .	flúida	"
Ll—Ascitis . . . . . Agar . . . . .	sólida y semi-sólida	"
M—Caldo corriente . Ascitis . . . . .		
Agar . . . . .	"	"
N—Emulsión testícu- lo conejo . . . . . Caldo corriente .		
Agar . . . . .	semi-sólida	escaso
Ñ—Caldo (corriente, Martín, Douglas, Huntoon) . . . . . Suero . . . . . Glóbulos rojos (humano, caballo, conejo) . . . . . Con o sin azúca- res . . . . .	flúida	negativo
O—Suero . . . . . Agar . . . . . Con o sin azúca- cares . . . . .	sólida	positivo
P—Sangre desfibri- nada . . . . . Agar . . . . . Con o sin azúca- res . . . . .	"	"

La lectura del cuadro demuestra: 1) que la B. b. no se cultiva ni en caldo, ni en agar corriente; 2) que no se cultiva en medio fluído; 3) que son necesarios los elementos químicos de la sangre para su desarrollo, y 4) que la consistencia del medio (gelatinosa o sólida) es un factor necesario a su multiplicación.

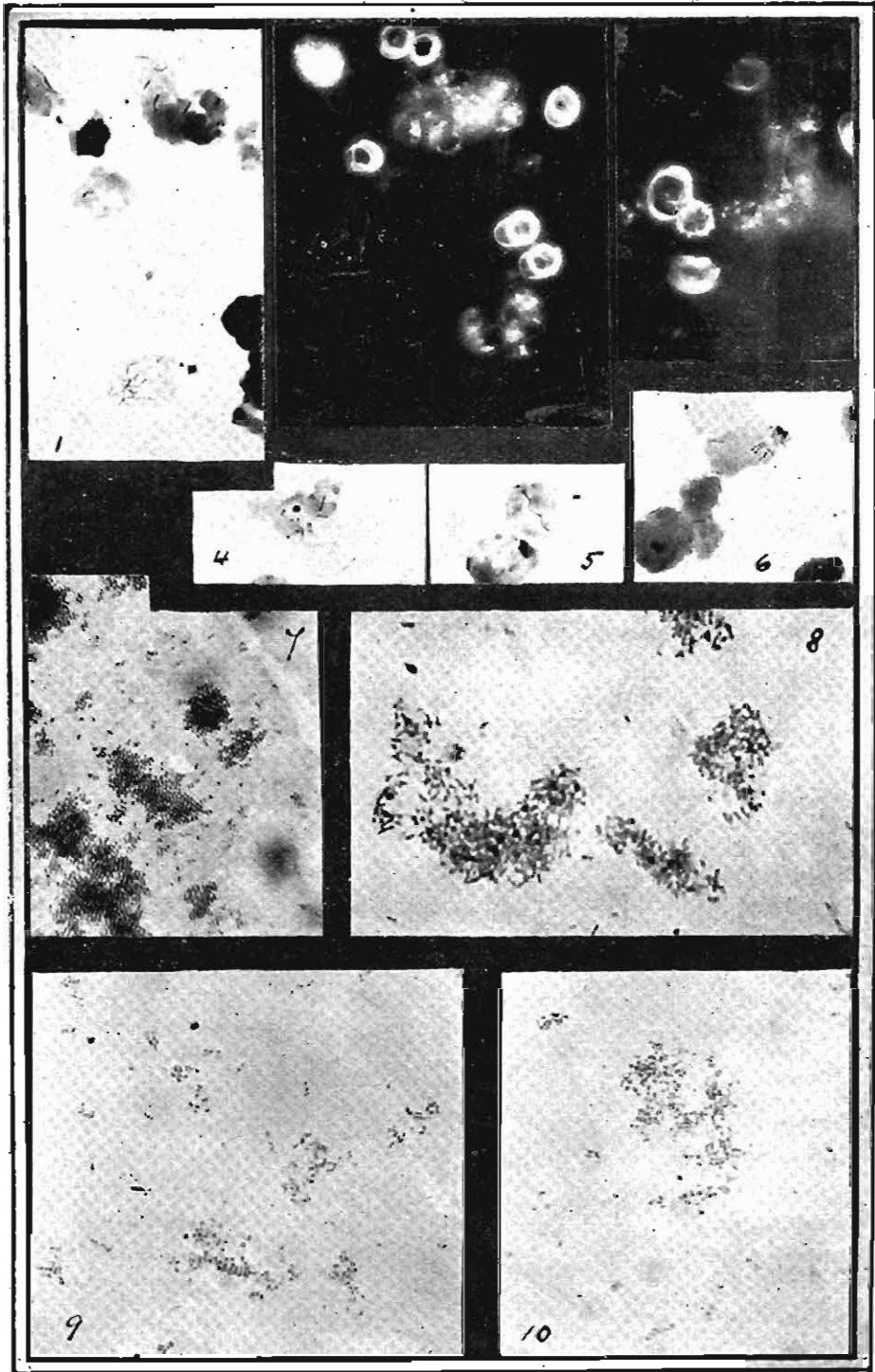
Una observación muy antigua respecto a este organismo (Drs. RIBEYRO, GASTIABUKÚ—comunicación personal, el suscrito) es la siguiente: en sangre oxalata, parasitada sola, mezclada con solución de citrato de sodio al 2%, con suero fisiológico, o en caldo corriente, y a la temperatura de 15 a 37°C., se asiste durante un tiempo más o menos largo (en relación con la temperatura) a la multiplicación un tanto activa de este organismo, multiplicación que se realiza a expensas de los materiales nutritivos aportados por la sangre original, y que en ningún caso debe tomarse como un verdadero cultivo, puesto que el resiembra en las mismas soluciones o medio, es imposible obtenerlo.

La B. b. se cultiva en condiciones de aerobiosis, y la temperatura óptima para su desarrollo es de 28°C.

#### CARACTERES CULTURALES

*Acción sobre los azúcares.* — De diez y siete azúcares (véase el cuadro) probadas, ninguna es afectada por este organismo. No hay formación de gas o ácido, ni el desarrollo de ningún olor característico. Esto se refiere tanto a cultivos recientemente aislados, cuanto a los que han pasado por un número de resiembros durante algunos meses.

PLANCHA No. 1



## PLANCHA I

- Fig. 1, 4, 5, 6.—*Bartonella bacilliformis*, sangre humana. Coloración Giemsa.  $1 \times 1.000$ .
- Fig. 2, 3.—*Bartonella bacilliformis*, sangre humana. Aspecto al campo obscuro; nótese el doble contorno en algunos elementos.  $1 \times 1.000$ .
- Fig. 7.—*Bartonella bacilliformis*, cultivo. Coloración Gram. Micro-fotografía tomada galantemente en 1923 por Miss Ethel Norris, de la School of Hygiene and Public Health, J. J. U.
- Fig. 8.—*Bartonella bacilliformis*, cultivo (edad 8 días), medio semisólido. Coloración Giemsa,  $1 \times 2.000$ .
- Fig. 9, 10.—*Bartonella bacilliformis*, cultivo (edad 8 días), medio sólido. Coloración Giemsa.  $1 \times 1.000$ .



SP.37-SA.15-SJ.3-SJ.19-SJ.45-SP.33-SP.41-SJ.22-P2C5

Anigdalina. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Arabinosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Dextrina. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Dulcita. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Galactosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Inulina. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Lactosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Levulosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Maltosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Manita. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Mannose. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Raffinosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Rahmnosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Sacarosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Salicina. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o
Xilosa. . . . .	o	o	o	o	o	o	o	o	o

*Acción de la concentración en iones hidrógeno.* — Los límites de concentración en iones hidrógenos del medio de cultivo, que permiten el desarrollo de este organismo, son bastante amplios, y equivalente a pH-6.8 — pH-8.2. Un mejor desarrollo se obtiene en los medios alcalinos. No hay alteración manifiesta del pH por la multiplicación del germen. La reacción óptima es equivalente a un pH-7.4 — pH-7.6.

*Acción del calor y desinfectantes* — Una temperatura de 56°/C. por 10 minutos ó 60°/C. por 5 minutos, basta para matar este organismo. Formol, tricresol y lisol al 1%, esterilizan un cultivo en 10 minutos. La glicerina al 40% y la bilis al 10%, matan este organismo en 24 horas, sea a la temperatura del laboratorio, 25°/C., o la de la nueva 10°/C.

FILTRABILIDAD

La B.b. sea en cultivo o en la sangre del enfermo, no franquea los poros de las bujías V o N Berkefeld.

*Método* — Para las pruebas se han usado cultivos en medios sólidos. El desarrollo obtenido al 6° ó 7° día de incubación es suspendido en solución salina estéril o en buffer solu-

ción de pH-7.4, cuidando al lavar el desarrollo de no arrastrar partículas del medio, la suspensión bacteriana obtenida se lleva en cada cultivo al mismo grado de opacidad, diluyendo con cualquiera de las soluciones en uso o concentrando por centrifugación, según sea el caso. Con el grado de vacío empleado por nosotros, en dos minutos obtenemos el pasaje de tres centímetros cúbicos de flúido, usando bujía Berkefed V.

Cuando se trata de sangre, esta es recogida en una solución de citrato de sodio al 2%, y diluída posteriormente con solución salina al 1|6, centrifugada a la velocidad y tiempo necesario que permita la sedimentación de los elementos figurados de la sangre, y finalmente, el líquido sobrenadante ligeramente opalescente pasado a través de la bujía. En tres minutos pasan por la bujía Berkefeld tipo V, dos centímetros cúbicos.

Tanto la emulsión bacteriana, cuanto la sangre así diluída, no filtradas, eran usadas como controles.

La negatividad de los experimentos realizados, no invalidan, por lo demás, la posibilidad de la existencia de una fase filtrable en el ciclo evolutivo de la B.b.

El cuadro adjunto presenta los experimentos realizados.

Sangre Caso	Cultivo Caso	V	N
S.A.15		—	—
S.P.37		—	—
S.P.33		—	—
S.P.41		—	—
S.F. 7		—	—
S.B.19		—	—
	S.A.15	—	—
	S.P.37	—	—
	S.J. 3	—	—
	S.J.22	—	—
	P2.C5.	—	—
	P2.C32.	—	—
	S.B.19	—	—

## SUPERVIVENCIA

Ya desde los primitivos estudios morfológicos de este organismo (modificaciones que sufre la B.b., en sangre original a distintas temperaturas), y de su habilidad de multiplicación en medios ineficientes a su cultivo (caldo común, solución citratada), que hiciéramos al comienzo de nuestros trabajos sobre la Verruga Peruana, nos convencimos del alto grado de supervivencia de la B.b., observación, que nos hizo dudar desde entonces de la naturaleza protozoica de ella.

La B.b. en sangre original citratada, a la temperatura de 14 a 26°C., permanece viable por tres meses y un mes respectivamente. En los cultivos en medio semi-sólido, a la temperatura del laboratorio (22-25°C.) y sin ninguna precaución que impida la desecación del medio, la B.b. sobrevive por 60 días. En medios sólidos, pero cuyo grado de humedad se mantiene óptimo por adición de flúido cada cierto tiempo, la B.b. se encuentra viable hasta los 40 días a la temperatura del laboratorio.

## APÉNDICE

*Método simple de cultivo* — Tratándose de sangres bien parasitadas, procédase de esta manera: una pequeña gota de sangre obtenida por punción del dedo (previa desinfección con alcohol iodado y éter) es recogida en una pipeta capilar estéril; en la misma pipeta absórvase 0.2 a 0.3cc. de medio semi-sólido, ciérrase a la lámpara la extremidad afilada de la pipeta y colóquese esta a la estufa a 28°C. Al absorber el medio de cultivo se hace de modo natural la mezcla de éste con la sangre. A los 5 ó 6 días de incubación examínese la pipeta, y se observará entonces uno u otro de los aspectos culturales de este organismo, a que hemos hecho ya referencia.

*Cultivo de la B.b. del nódulo verrucoso* — Siendo muy frecuente la contaminación de la emulsión de verrucomas, por los agentes saprofíticos de la piel (estafilococos), nosotros para salvar tiempo y material, hemos recurrido en muchas ocasiones

al método que podemos llamar indirecto, y que consiste, en inocular la emulsión de verrucoma al testículo del conejo, órgano que como es bien sabido, ofrece un excelente medio de multiplicación in vivo para la B.b., extirpar este órgano al 7º ó 9º día, y sembrar un pequeño fragmento de testículo en cualquiera de los medios señalados. De esta manera se obtiene un cultivo puro de B. b. en cien por ciento de los casos.

Lima, agosto 24 de 1927.

---