

REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Director, Profesor JORGE E. CAVELIER

VOL. II

Bogotá, diciembre de 1933.

N.º 7

AL MARGEN DE LA SEROTERAPIA ANTILEPROSA

Y DEL CULTIVO DEL BACILO DE HANSEN

Por J. GRILLO

(Del Laboratorio de Serología, Departamento Bacteriológico, del Instituto de Higiene del Reich. Berlin-Dahlem)

A fines del siglo pasado, al mismo tiempo que un procedimiento seroterápico aplicado a la enfermedad hanseniana hacía su aparición en el Laboratorio del doctor Carrasquilla, una esperanza nueva nacía en el corazón de las ciudades que habitan los que la sociedad repudia. Seis, quizá diez mil o más leprosos vieron la luz de una ilusión que nada confundía con las que propagan los charlatanes, hábiles explotadores de una clase indefensa. Una escuela nueva pareció nacer. Los ensayos se multiplicaron y amplificaron hasta que, por razones que no sorprenderían al sociólogo que conociese los compatriotas de Santander, la duda y el desaliento colectivos, cuando no la mala voluntad, troncharon en sus comienzos un estudio cuyo interés quisiéramos hacer resaltar en éste modesto trabajo.

No es nuestro propósito extendernos sobre la vasta obra de Carrasquilla Lema. Plumas autorizadas han trazado el retrato psicológico de ese luchador infatigable, cuya memoria veneran todos los que conocen su labor de tantos años. Sólo un deseo, ambición ilusoria tal vez, nos ha movido para escribir sobre la seroterapia antileprosa. Pretendemos, y ésta no ha sido una preocupación de pocos meses, presentar a las mejorías o curaciones observadas por Carrasquilla, una explicación que satisfaga las exigencias científicas actuales. Si nos ha sido dable llenar ese cometido, nuestro único objetivo consiste en despertar, entre los investigadores colombianos, la aspiración de continuar la obra iniciada por Carrasquilla Lema.

En la segunda parte de este trabajo trataremos, aunque someramente, el problema aún no resuelto del cultivo de *Bacillus Leprae*, otro indicio de la actividad de Carrasquilla y tema que, a pesar de ser in-

grato, han estudiado numerosos autores. Como los antiguos, los trabajos recientes, realizados con las técnicas más modernas, no demuestran la relación que pueda existir entre un germen semejante al Bacilo de Hansen, aislado de enfermos de lepra, y la etiología de esa enfermedad.

En su “Tercera Comunicación sobre un procedimiento seroterápico aplicado al tratamiento de la lepra griega”, presentada a la Academia de Medicina de Bogotá el 24 de junio de 1896, describe Carrasquilla la fabricación de un “suero anti-leproso”, preparado por inmunización del caballo con suero sanguíneo de enfermo de lepra y, después de indicar las medidas que deben observarse para la conservación de los sueros, aborda la cuestión de las dosis y resume las reacciones consecutivas a la inyección del suero terapéutico. Dice también haberse basado en los trabajos de *Richet* y *Maragliano*, quienes preparan, por un procedimiento semejante, sueros anti-sifilítico y anti-tuberculoso, respectivamente. No oculta el autor la vacilación en que se halló frente de los dos caminos que se le ofrecían: inmunizar los caballos con suero de leproso o simplemente, cómo se preparaba entonces un suero anticanceroso, partiendo de un antígeno formado por una suspensión de nódulos leproso, ricos en bacilos. Carrasquilla optó por el primero. *Richet* preconiza practicar la sangría del sifilítico en el momento de la roseola, cuando la enfermedad se halla en toda su actividad evolutiva; Carrasquilla busca “uno de esos accesos que ofrece la enfermedad periódicamente, cuando la sangre contiene mayor toxicidad o potencia”. Partiendo de esta idea, dos años después, en Berlín, emitía la siguiente opinión, sujeta a severas críticas: “Creo pues, que teóricamente puede admitirse que el suero de la sangre de un leproso es una toxina, que tiene las propiedades generales de todas las sustancias así designadas, y entre ellas la de provocar en los animales la fagocitosis y la formación de una antitoxina”. Más adelante, en la misma Memoria presentada a la Conferencia de Berlín (1897) puede leerse: “Siendo esto así, el suero de los animales vacunados con la toxina leprosa (suero de enfermo) aplicado al hombre leproso, debe neutralizar en él los efectos de dicha toxina, debe inmunizarlo, debe curarlo. Tal es el principio en que fundo el tratamiento seroterápico de la lepra, cuyos resultados ha manifestado la práctica. Sea ésta la explicación que satisfaga a los hechos comprobados o sea cualquiera otra, el hecho de las modificaciones obtenidas en los enfermos se impone ante todo”. No queda pues lugar a duda, Carrasquilla consideró el suero

y su acción como específicos de la lepra. *Hallopeau*, en su informe a la Academia de Medicina de París, sobre el suero Carrasquilla, fue el primero en negar la especificidad de la seroterapia antileprosa; según el ilustre dermatólogo francés, las mejorías producidas por el tratamiento, observadas por varios autores, se deben a las propiedades tónicas de cualquier suero animal. Explicación demasiado fácil en ve que, por lo demás, no encuentra fundamento en ningún hecho experimental, pero que, ella sola, bastó para que el método Carrasquilla fuera relegado al olvido. Si la primera parte del postulado de *Hallopeau* (la no especificidad del suero Carrasquilla) es absolutamente evidente, la segunda constituye un ejemplo de esa ligereza que hemos reprochado a los críticos del investigador colombiano. El suero Carrasquilla, a pesar de ser específico, tiene necesariamente que poseer propiedades capaces de determinar la desaparición de los tubérculos, la cicatrización de las ulceraciones, la vuelta de la sensibilidad y la mejoría del estado general porque, como dice Carrasquilla, esas modificaciones se imponen ante todo. En contra de la especificidad del procedimiento se alegó, no sin razón, el hecho de que el bacilo de Hansen o sus derivados excepcionalmente se hallan en la sangre. *Serra 1)* señala el caso de una enferma de lepra que, contrariamente a lo que se observa de ordinario, presentaba la menorragia habitual. En la sangre menstrual fue fácil encontrar el bacilo de Hansen; la sangre extraída de la vena del pliegue del codo, en cambio, se mostró siempre exenta de bacilos. El autor cree que los gérmenes, en el curso de un acceso infeccioso agudo, se localizaron en la mucosa uterina, como pueden hacerlo en las mucosas de las vías respiratorias superiores. Sostienen también algunos autores 2) que la lepra, considerada como una enfermedad cutánea y nerviosa por la mayoría de los patólogos, puede ser al mismo tiempo septicémica y visceral, que evoluciona por accesos sucesivos de bacilemia. Una de las dos observaciones presentadas por de *Beurmann* y sus colaboradores no nos parece ser demostrativa toda vez que se trata de un leproso muerto de tuberculosis. La otra observación también carece de objetividad: es el caso de un leproso muerto en el curso de una intervención quirúrgica (sarcoma) en las serosas del cual, pleuras, peritoneo y meníngeas, así como en los glomérulos del riñón, fue hallado el bacilo de Hansen. Bien conocidas son las localizaciones viscerales y las bacilemias 2.^a) causadas por *Bacillus Leprae*, que se explican toda vez que ese germen es huésped de las células migratorias que, seguramente, son las que eventualmente pueden lle-

varlo a la sangre 2b) 2c). Otro tanto puede decirse de las bacilurias que han sido descritas en el período de estado de la lepra 3) 4) 5) y de ciertas localizaciones del bacilo en los órganos internos estudiadas por *Sugai* 6) y otros. Es lícito pensar que las crisis piréticas que a menudo sobrevienen en la lepra, corresponden a uno de esos pasos de las células migratorias, cargadas de bacilos, a la circulación general (*Marchoux*). En cuanto a las toxinas o derivados solubles del bacilo leproso, hablar de ellas es aventurada empresa, conociendo, como conocemos, tan superficialmente la biología del microbio. No obstante, *Babes* 7) pretende que existe en el bacilo de Hansen una verdadera toxina; el extracto de leproma produce, inoculado a los leprosos, una reacción semejante a la que determina la tuberculina en los tuberculosos. Dados los conocimientos que hoy poseemos sobre la alergia, la explicación de *Babes* resulta infundada. El mismo fenómeno se observa inyectando la *leprolina de Rost* o la *nastina de Deycke* 8) y es de carácter puramente alérgico. Convendría, conformándose con la definición, no designar con el nombre de toxinas sino aquellas substancias venenosas susceptibles de formar una antitoxina.

Aunque nos alejemos un tanto del asunto que tratamos, la ocasión parece propicia para estudiar las modificaciones sanguíneas, producidas algunas veces pero inconstantes en la lepra. El porcentaje de la hemoglobina desciende y los glóbulos rojos y blancos disminuyen de número, lo cual se explica por el estado de carencia en que se halla el organismo. Las lesiones morfológicas de los glóbulos rojos, frecuentes y acentuadas, son de ordinario las siguientes: anisocitosis, poikilocitosis, glóbulos nucleados, policromáticos y granulaciones basófilas 9). Es posible observar una eosinofilia marcada en todas las formas de la enfermedad, pero difícilmente podría atribuirse a la afección misma. La proporción relativa de los linfocitos aumenta al mismo tiempo que los mononucleares parecen estar bajo la normal 10). La imagen de Arneht es normal 11). En un cuidadoso estudio que *Sadi de Buen* 12) dedica a la materia, concluye que no es posible fijar una fórmula leucocitaria en la lepra. Lo que sí parece de todos aceptado es el hecho de que las alteraciones sanguíneas son más pronunciadas en la forma tuberculosa que en la nerviosa y la mixta.

Ranzi 13) fue el primero en observar que el suero de los enfermos de lepra desvía el complemento en presencia de un antígeno específico. *Eitner* 14) confirma esta observación pero reconoce que es necesario proceder con suficiente número de controles porque el suero

humano normal puede, aun a la dosis de 0cc.05 impedir la hemólisis. *Wechselmann y Meier* 15) obtienen la fijación del complemento por un suero leproso, seguramente no sifilítico, en presencia de un antígeno sifilítico. *Eitner* 16) así como *Levaditi y Yamanouchi*, preparan un antígeno acuoso de tejidos leprosos que fija la alexina de los sueros leprosos. Ahora bien, si se examinan diferentes sueros leprosos en presencia de antígenos diversos (extracto alcohólico de hígado heredo-sifilítico, extractos de leproma, sarcoma, carcinoma; tuberculina; emulsión de bacilos de Koch; suero antituberculoso de Hoechst etc.) 17) 18) se obtienen, la mayoría de las veces, reacciones más o menos uniformes. Sólo el extracto de leproma parece provocar una fijación específica en un 50 % de los casos 19). Según *Michaelides* 20) la reacción de Border-Wassermann da en la lepra los siguientes resultados: forma tuberculosa 75,9 por 100, nerviosa 38,0 por 100 y mixta 75,0 por 100 de positivos, datos que han podido comprobar *Lloyd Muir y Mitra* 21). Las modificaciones físico-químicas del suero leproso pueden variar mediante factores que nos son desconocidos pero que, es de presumir, están ligados a la forma clínica y gravedad de la enfermedad 22). Mientras que en las formas cutáneas la positividad de la reacción de Wassermann oscila entre 70 y 80 por 100, en las formas nerviosas solo se observa un porcentaje de desviación muy inferior 23) 24) 25). El suero leproso, por otra parte, puede de por sí fijar el complemento a la dosis de 0cc.04, lo que no sucede con ningún otro suero, como han logrado demostrarlo *Eliasberg* 26) y *Biehler y Eliasberg* 27). En nuestras anotaciones particulares encontramos que la mayoría de los sueros leprosos que hemos examinado impiden la hemólisis, independientemente del antígeno, desde 0cc.02. Sirviéndose de un antígeno preparado directamente con elementos bacilares mediante homogenización a la antiformina de productos leprosos, *Steffenhagen* 28) obtiene reacciones específicas en un porcentaje elevado. En oposición a los trabajos de *Steffenhagen*, de *Haan y Grijns* 29) indican haber constatado que la desviación del complemento, que se manifiesta empleando la piel leprosa como antígeno, se produce también si ésta se reemplaza por piel humana normal. La reacción no sería por consiguiente específica.

Todos estos datos han hallado en trabajos ulteriores, 30) 31) 32) 33) 34) 35) 36) 37) 38) una comprobación que nos permite concluir con *Eliasberg* 39) que en el suero sanguíneo de enfermos de lepra puede ponerse en evidencia la presencia de un amboceptor pero no

la de una alexina libre, fenómeno que también ocurre en la parálisis general. Anotemos de paso que *Eliasberg* (loc. cit) no oculta su inclinación a establecer una relación entre la difícil curabilidad de estas enfermedades y el hecho de la ausencia de alexina, mientras que el amboceptor se halla presente en la sangre.

Si continuamos pasando en revista los trabajos serológicos que se han hecho sobre la materia, debemos citar ante todo los experimentos de *Lewis y Aronson* 40) que han logrado, preparando un extracto acuoso del bacilo ácido-resistente cultivado por *Clegg*, a pesar de la dudosa relación que éste germen tiene con la etiología de la lepra, reacciones de fijación positivas en un 94 por 100 de los sueros leprosos examinados. Numerosos son los investigadores que han insistido sobre una posible asociación de sífilis y lepra en los casos en que el Wassermann es positivo en los leprosos; sin embargo, el tratamiento antisifilítico no tiene ninguna influencia sobre la reacción de Wassermann en esta clase de enfermos 41) 42). El interesante experimento de *Banciu* 43) vino a poner fin a la dificultad de interpretación del Wassermann en la lepra. *Banciu* inyecta en efecto conejos con una emulsión decantada de leproma (1 a 2 cc. en las venas) y observa que el suero de esos animales fija la alexina frente de un antígeno leproso pero permanece inactivo en presencia del extracto de hígado here-dosifilítico.

La prioridad en el empleo de las reacciones de floculación, para el diagnóstico de la lepra, corresponde a *Capelli* 44), quien, como más tarde de *Area Leao* 45) y *Wade* 46) tuvieron ocasión de hacerlo, observó que estas reacciones son menos frecuentemente positivas en la lepra que las de fijación y que de la suerte, pueden ser de alguna utilidad en el diagnóstico diferencial de la sífilis. La reacción de *Matefy* 47), que no fue aceptada para el diagnóstico de la tuberculosis, al decir de *Marras* 48) es constantemente negativa en la lepra. *Girard y Robic* 49), *Lai y Wang-Lai* 50), *Leger* 51) y *Sanjurjo* 52), que han experimentado las reacciones de Meinicke, Kahn y Vernes, confirman los trabajos de *Capelli*.

Dos reacciones más han sido ideadas en los últimos años: la de velocidad de sedimentación y la de formolgelificación. Esta última, que *Die* había preconizado, se muestra incapaz de indicaciones precisas en la lepra 53). En cuanto a la de velocidad de sedimentación que *Gilbart, Tzanck y Cabanis* 54) estudiaron en 1926, presenta una aceleración considerable en la casi totalidad de los sueros leprosos. El por-

centaje de positividad (50-94 %), la especificidad y la técnica de la reacción han sido objeto de numeroaos trabajos, de la mayoría de los cuales es preciso concluir que la reacción de velocidad de sedimentación es un medio de innegable utilidad en la serología de la lepra, 55) 56) 57) 58) 59) 60) 61). *Peltier* 62) pretende no obstante que ésta reacción carece de la especificidad que algunos autores le han atribuido y que sólo se manifiesta positiva en los casos de lepra tuberosa antigua. Los resultados específicos varían, en la opinión de *Peltier*, entre el 22 y el 53 por 100; los resultados positivos en casos seguramente no leprosos ascienden al 17,33 por 100. Por el contrario, los recientes trabajos realizados en el Instituto Pasteur de Atenas demuestran plenamente el valor de la reacción de *Rubiño*.

El estudio bioquímico de la sangre de los enfermos de lepra tampoco presenta consideraciones que puedan tenerse en cuenta. Las variaciones señaladas por los autores que se han ocupado de la cuestión parecen ser tan aleatorias como las modificaciones serológicas que acabamos de enumerar. En la lepra, el peso específico de la sangre es, en la generalidad de los casos, inferior a la normal 63); el tenor en sustancias nitrogenadas no proteicas parece aumentado, sobre todo en cuanto al nitrógeno de la urea y al ácido úrico se refiere (aun en los casos en que la función renal es normal); la creatinina y el azúcar también están sobre el nivel de la normal, aunque en menor cantidad que los dos primeros. Los cloruros son normales. La reserva alcalina no difiere de la de los sujetos alentados 64). La colessterina, en cambio, se encuentra en cantidades inferiores a la normal (0grs. 96 a 0,88 por 100) y ésta disminución parece estar en relación con la gravedad de la enfermedad 65).

Buscando la manera de identificar al bacilo de Hansen un bacilo ácido-resistente cultivado por ellos, *Currie* y *Clegg* 66) obtienen aglutinarlo al 1.50 con el suero de enfermos de lepra, mientras que otros gérmenes ácido-resistentes (bacilos de la margarina, de la mantequilla y de las gramíneas) no aglutinan en presencia de los mismos sueros. Si existiera la certidumbre de que el bacilo de *Currie* y *Clegg* es realmente un bacilo leproso, la investigación de las aglutininas constituiría un método sencillo para poner en evidencia e identificar los anticuerpos específicos. Desgraciadamente nada nos autoriza para concluir por la especificidad. El experimento de *Currie* y *Clegg* nada prueba pues esos autores omitieron estudiar la acción de los sueros humanos nor-

males sobre su bacilo que, la suposición no es infundada, bien puede aglutinar espontáneamente.

Después de esta revista general de la serología de la lepra, que era indispensable para el orden del plan de trabajo que nos hemos trazado, volvamos a considerar la seroterapia anti-leprosa. ¿Qué es pues el suero Caarasquilla? *Metchnikoff* y *Besredka* fueron quienes antes que nadie se preocuparon por responder a ésta cuestión (67). Abandonando el método seguido por Carrasquilla, los investigadores del Instituto Pasteur repitieron los estudios de *Olaya Laverde* y llegaron a la conclusión de que la inyección de elementos celulares a un animal de otra especie produce en él la formación de venenos, las *citotoxinas*, que pueden destruir los elementos celulares homólogos del animal dador. Estos autores inyectan a una cabra pequeñas cantidades de sangre humana defibrinada (hombre sano) y obtienen de la sangre un suero fuertemente aglutinante y hemolítico para los glóbulos rojos del hombre. La inoculación a los leprosos de este suero determina una “disminución de los dolores, de la congestión y de la supuración de los lepromas y provoca una reacción febril”. “En una palabra, aunque mucho menos favorables, los efectos de este suero presentan grandes analogías con los producidos por los sueros de Carrasquilla y de *Olaya Laverde*”. *Metchnikoff* y su colaborador creen que la acción favorable de estos sueros debe atribuirse a la *leucotoxina*, resultado de la introducción al animal de productos leucocitarios humanos. Esta *leucotoxina*, inyectada a los enfermos en dosis adecuadas, provocaría una excitación del sistema leucocitario. Dados los inconvenientes de las *hemotoxinas*, los autores recomiendan emplear el método Carrasquilla o inyectar los animales con suspensiones de ganglios linfáticos humanos normales.

La explicación de *Metchnikoff* y *Besredka* que, a primera vista, se presenta con apariencias de verdad, no es tampoco a la que adheriremos nosotros. *Kraus*, antes que cualquier otro, en 1897, había señalado lo que él denominó *spezifische Niederlaege*, las precipitinas específicas. Algunos años más tarde, *Bordet* y *Tsistowitsch* aportaban a la ciencia el bello descubrimiento de las “precipitinas albuminoideas” cuyas utilidades prácticas en medicina legal nadie ignora. *Wassermann*, *Uhlenhuth*, *Schütze*, *Kraus* y *Eisenberg* y muchos investigadores más, han perfeccionado, por medio de experimentos particularmente interesantes, nuestros conocimientos sobre la materia. Sabemos que, en efecto, la inyección de suero sanguíneo (y en general de toda clase de pro-

Revista de la Facultad de Medicina.

teñas) de un animal, a un animal de otra especie, provoca en él la aparición de un principio activo, destructible a 70°, que, mezclado *in vitro* con el suero del animal dador, forma un precipitado. El suero Carrasquilla es pues antes que todo un suero precipitante, un suero anti-humano. Pero ¿qué producirá la inoculación al hombre de un suero precipitante anti-hombre? *Friedberger* y *Hartocg* (68), *Sleeswig* (69), *Doerr* y *Russ* (70), *Friedmann* (71) y otros han sostenido que la reacción anafiláctica es análoga a la reacción de precipitina. *Friedberger* va aún más lejos afirmando que la anafilaxia se debe a la formación *in vitro* de una precipitina. *Doerr* y *Moldovan* (72) demuestran que “desde que haya una reacción precipitante, aunque sea débil, puede existir una anafilaxia pasiva y, al mismo tiempo, la desaparición del complemento”. Partiendo de la base de que la anafilaxia se debe a una precipitina, *Friedberger* ha podido comprobar que el precipitado, obtenido por reacción del antígeno sobre el suero, es un producto tóxico, capaz de determinar fenómenos anafilácticos. Esta clase de precipitado es lo que ese autor llama *anafilatoxina* y que *Richet* designa con el nombre de *apotoxina*. *Richet* (72) establece la ecuación siguiente:



Empleando la terminología de la anafilaxia, podemos decir que el suero de Carrasquilla es una *toxogenina*, una substancia que mezclada con los elementos albuminoideos homólogos que sirvieron para su preparación, formará un precipitado tóxico, una *apotoxina*, o *anafilatoxina*. Ciertamente no precisaba ir tan lejos para descubrir la naturaleza del suero antileproso. Carrasquilla mismo, naturalmente sin haber entrevisto el alcance de fenómenos semejantes (*Richet* comenzó sus trabajos sobre la anafilaxia en 1902), describiendo las “reacciones normales” que acompañan la administración de su suero, nos recuerda esa página en que *Richet* traza los grados o fases de la anafilaxia. “La cantidad de suero humano inyectado al caballo—dice el autor colombiano en su Tercera Comunicación, p. 5— también influye sobre la potencia del suero, pero en menor grado que el tiempo, según mis observaciones”. En la misma comunicación, página 18, puede leerse: “... he observado que el suero obra con mayor actividad cuando se ha suspendido por algún tiempo su aplicación”. Aquí, puede afirmarse sin lugar a temeridad, Carrasquilla parece haber presentado lo que hoy se llama incubación de la anafilaxia. En otro lugar habla el leprólogo colombiano de un enfermo tratado por vía oral en el cual las “reacciones normales” no se presentaron antes de la sexta admi-

nistración del suero. Sabido es que difícilmente se produce la anafilaxia por ingestión; sin embargo, *Rosenau* y *Anderson* la han provocado mediante condiciones especiales.

Inútil hubiera sido sostener hace algunos años que las mejorías debidas a la seroterapia y observadas no solamente por Carrasquilla sino por *J. E. Manrique*, *M. Rueda*, *Buzzi*, *Abraham*, *Arning* y otros en el curso clínico de la lepra, eran la resultante de un choque anafiláctico. En 1927 señalaba *Muir* (74) que el kala-azar tiene una repercusión benéfica sobre la lepra cuando la infección hanseniana es antigua. En trece casos, sobre diez y seis observados, en los que la infección por *Leishmania donovani* se ha asociado a la lepra, el autor constata una notable mejoría de las lesiones cutáneas y demás manifestaciones morbosas. *Muir* explica este fenómeno por una estimulación de la fagocitocis que tendría como consecuencia la destrucción de los bacilos, ya en los vasos, ora al nivel de los tegumentos. *França* (75). Había observado efectos semejantes cuando, en un terreno leproso, sobreviene una viruela. Estas observaciones no están lejos de ser asimilables a la acción, descubierta en 1917 por *Wagner von Jaureg*, del paludismo sobre la parálisis general. Arriba decíamos que *Eliasberg* encuentra una relación entre la parálisis general y la lepra en el sentido de que en ambas enfermedades la sangre carece de alexina libre, mientras que el amboceptor se halla presente. Otra particularidad que no debe pasar inadvertida es la de que *Muir* precisa que la influencia del kala-azar se limita a los períodos más avanzados de la afección, que al comienzo de la enfermedad la leishmaniosis no tiene ninguna acción sobre la evolución de la lepra. Lejos de nuestra intención la idea de establecer un paralelo entre las dos afecciones. Si ellas tienen un carácter común no es otro que el de ser, a igual título la una que la otra, dos enfermedades infecciosas crónicas. No sería atrevido decir que las infecciones crónicas se caracterizan precisamente por una disminución de la capacidad orgánica de resistencia o, en otros términos, por defectos del proceso inmunológico. Pero no solamente los fagocitos son susceptibles de una sensibilidad especial respecto de un antígeno determinado. En materia de inmunidad nos encontramos frente de un conjunto de reacciones de defensa emanadas de diversas células. Preciso es pues, contrariamente a la opinión de *Muir*, aceptar que *Leishmania donovani* debe obrar simultáneamente sobre varios órganos, cuya sensibilización basta para determinar la formación de los anticuerpos.

En un principio se consideraron todos los fenómenos de esta naturaleza (infecciones mixtas, acción de una infección sobre otra) como el efecto de los llamados antagonismos microbianos. Los recientes estudios hechos en el Laboratorio de Serología del Instituto de Higiene del Estado Alemán, 76) 81) sobre las infecciones secundarias y mixtas, demuestran hasta la saciedad la inexactitud del antagonismo como explicación de acción pasajera o durable que ejerce una infección sobre otra. *Krumeich y Grillo* 77) estudiando las condiciones en que el recargo de un proceso infeccioso agudo puede influir benéficamente sobre la evolución de una enfermedad infecciosa crónica, demuestran, en confirmación de experimentos anteriores nuestros 76), que la sensibilización de las células receptoras encargadas de crear el estado de inmunidad, requiere un estímulo *frecuente y prolongado* por parte del germen de infección secundaria. El estudio del mecanismo de las infecciones mixtas ha conducido a *Schlossberger y Grillo* 78) a la observación de las diversas reacciones que se operan en el sistema retículo-endotelial, principal órgano sensibilizado por los gérmenes de infección secundaria. Para que dicha sensibilización tenga lugar, así parecen por lo menos demostrarlo todos los experimentos, se requiere aportar al sistema retículo-endotelial una modificación cuyo efecto sea ya la producción de mayor número de células receptoras, ora células más aptas para la formación de los anticuerpos específicos. *Kroo y von Jancso* 79), *Hassko* 80) y otros habían indicado que el oro coloidal, por ejemplo, normalmente retenido por las células de Kupfer, deja de serlo si algunas horas antes de la impregnación se inocula al animal una pequeña cantidad de cobre electro-coloidal. Sabido es que el cobre destruye el sistema retículo-endotelial y que la regeneración de este órgano requiere un espacio de tres a cuatro días. La *Espiroqueta* Hispánica, empleada por nosotros como germen de infección secundaria y cuya acción sobre la tripanosomiasis a *Nagana* estudiamos *Kawamura* 81), en los ratones blancos y, más tarde, nosotros mismos (Loc. cit) en los cobayos, a semejanza del cobre, hace permeables las células de Kupfer. No cabe duda que igual cosa acontece experimentando con otros microorganismos. Por otra parte, nosotros logramos demostrar que la inyección de cobre electro-coloidal, de por sí indiferente y absolutamente específica de la tripanosomiasis, a cobayos infectados de *Tripanosoma brucei*, basta para modificar, en el sentido de una mejoría, el curso de la enfermedad 76). De suerte que la regeneración de las células receptoras, cuando el organismo se halla

impregnado de los gérmenes de infección primaria, es suficiente, como en el caso de la infección mixta, para determinar una excitación más o menos intensa de las fuerzas defensivas del organismo. Ahora bien, la proteínoterapia, hoy tan en boga, está indicando que a la base de esa propiedad que presentan algunas sustancias y algunos microbios de excitar los centros defensivos del organismo, se encuentra *invariablemente* una profunda *modificación del metabolismo*. Prueba de ello son, entre otros, los trabajos de *Sauerbruch* y *Herrmannsdorfer* 81 a) sobre el tratamiento de ciertos procesos tuberculosos, mediante un régimen alimenticio adecuado. Es pues posible, con muchas probabilidades de verosimilitud, comparar el fenómeno observado por *Muir*, en el cual el kala-azar tiene una acción sobre la evolución de la lepra, al otro que consiste en las mejorías producidas por un suero anti-humano en el curso clínico de la enfermedad hanseniana.

Grave error cometería quien dudase de los efectos del suero Carrasquilla, que ese autor observó tan serenamente y de los cuales hizo una descripción precisa. Ciertamente el método seroterápico de la lepra no está exento de errores que, en su mayor parte, se deben a la carencia en que se halló el autor de una biblioteca adecuada. Pero cuando se llega al final de su "Tercera Comunicación" y se lee la frase siguiente: "Ignoro si la reacción (consecutiva a la inyección del suero) es condición indispensable para el buen éxito del tratamiento, porque todos los enfermos la han tenido....", admirable muestra de inequívoca clarividencia, se siente el lector tentado de ver en Carrasquilla uno de los más comprensivos precursores de la Anafilaxia.

La hipótesis de la acción del suero antileproso como modificador del metabolismo y estimulante del sistema retículo-endotelial que dicho sea de paso, se funda en los trabajos experimentales que trajeron la explicación de la malarioterapia, es tanto más sostenible cuanto que la clínica se halla en capacidad de aportarle una comprobación efectiva. El argumento de las diferencias reaccionales entre el hombre y el animal se encuentra por consiguiente desprovisto de fundamento. A las observaciones de *Muir*, de las cuales ya hemos hablado largamente, agreguemos las de *Correa Netto* 82) que no solamente las confirman sino que las complementan. Es de notar que en estos casos la enfermedad secundaria no ha sido el efecto de la experimentación sino el resultado de una contaminación espontánea. En otro lugar 78) tuvimos ocasión de señalar que, cuando la acción de la infección mixta es favorable al paciente, el momento de la sensi-

bilización de las fuerzas defensivas del organismo es decisivo tanto para la mejoría como para la curación. Por esta razón aprovechamos la oportunidad que nos ofrecen los estudios de *Fujiwara* 83), quien ha ensayado la malarioterapia en el tratamiento de la lepra. Los resultados obtenidos, aunque alentadores, no tienen todo el interés que debieran presentar, lo cual atribuimos a la poca intensidad de la infección palustre. El autor indica que en el espacio de ocho meses sólo pudo constatar en los enfermos sometidos a la malarioterapia de 5 a 13 crisis palúdicas. En doce casos de lepra (6 de forma maculosa, 3 de nerviosa, 1 de tuberosa y 2 de mixta) *Fujiwara* pudo observar una mejoría apreciable durante los accesos palúdicos. La evolución de la lepra, no obstante, después de la curación del paludismo, tornó a tomar su marcha normal. Es de suponer que el virus palustre pierde progresivamente su virulencia en los pasajes repetidos de hombre a hombre. De todas maneras, hay que admitir que el hematozoario ejerce una acción favorable sobre el cuadro clínico de la lepra. La inyección intravenosa de 5 cc. de leche estéril, diluïdos en 9 partes de agua destilada produce, por otra parte, después de una crisis febril aguda (40 a 41°), la cesación de los dolores, la cicatrización de las ulceraciones, la reabsorción de los nódulos etc. 84). Cuatro de los doce enfermos así tratados fueron sometidos a una larga observación durante la cual pudieron apreciarse los beneficios del tratamiento. Hace algún tiempo indicamos que la inyección endovenosa de *Pyrifer*, extracto bacteriano usado corrientemente en termoterapia, produce en los cobayos infectados de *Tripanosoma Nagana* una acción que se traduce por la debilitación de la enfermedad, la desaparición temporal del parásito y la evolución de la infección hacia la cronicidad 85). Esta observación tiene grande similitud con las que pueden hacerse estudiando la infección mixta por *Nagana* y *Espiroqueta Hispánica*, de la cual ya hicimos mención. En tales condiciones podía pensarse, dados los efectos de la inyección de cobre electro-coloidal sobre las células retículo-endoteliales, que el *Pyrifer* obra de manera análoga, es decir que: este producto, además de la elevación térmica que ocasiona, destruye, por lo menos parcialmente, el sistema retículo-endotelial. Trabajos posteriores 86) han venido a convencernos de la verdad de esta suposición. Hemos podido anotar, en efecto, que después de la administración de una fuerte dosis de *Pyrifer*, por vía intravenosa, las células de Kupfer del ratoncito blanco no presentan, como normalmente, el fenómeno de la retención del oro coloidal. Debemos pre-

cisar sin embargo que la acción del *Pyrifer* no es tan marcada como la de la Espiroqueta Hispánica, por ejemplo, y mucho menos que la del cobre electro-coloidal. Agreguemos que nada autoriza para admitir que todo el conjunto de las células retículo-endoteliales es destruído simultáneamente. Por el contrario, es lógico pensar que la acción de los destructores de ese sistema carece de uniformidad.

Ahora bien, sentado el hecho de la destrucción del sistema retículo-endotelial y de los interesantes efectos de su regeneración cuando el organismo se halla invadido por un agente infeccioso, réstanos estudiar las condiciones en las cuales un cambio determinado del metabolismo puede operar la mejoría o aun la curación de ciertas enfermedades infecciosas crónicas. Este es, nos apresuramos a decirlo, un estudio excepcionalmente complicado y cuya solución, hoy por hoy, no es fácil entrever. De lo expuesto se deduce la significación de la elevación de la temperatura corporal. Sin embargo, se ha concedido a la termoterapia una importancia que, a nuestro modo de ver, es exagerada. Habría que precisar antes que todo las circunstancias en las cuales la piroterapia pueda influír sobre el sistema retículo-endotelial y el momento —particular para cada enfermedad— en que es conveniente provocar las reacciones febriles. La intensidad de éstas, su frecuencia, la duración, el número de veces que deban repetirse etc., son tantos temas más reservados a la investigación.

Trabajos posteriores a los de *Fujiwara*, en cuyos pormenores nos es imposible entrar a causa del poco espacio de que disponemos (87), en los cuales se ha ensayado en grande escala la malarioterapia en el tratamiento de la lepra, contribuyen a solidificar los argumentos que nos hemos permitido traer en apoyo de la explicación que proponemos al mecanismo de la seroterapia de Carrasquilla.

Nada puede decirse en definitiva respecto de la eficacia del tratamiento. Si Carrasquilla hubiese logrado formar una escuela, sus discípulos podrían enseñarnos lo que de la práctica y el estudio del método hubieran aprendido. El sabio colombiano no tuvo discípulos. Esa fuente de conocimientos, como tantas otras, no sedujo los investigadores colombianos. No es perspicacia suponer que el suero antisifilítico de *Richet*, que ciertamente producía efectos comparables a los de Carrasquilla, fue el punto de partida que se ofreció al genial descubridor de la Anafilaxia.

Quiénes están acostumbrados a consultar la literatura de la lepra
Revista de la Facultad de Medicina.

ven, de tiempo en tiempo, aparecer trabajos el los cuales sus autores declaran haber aislado, en cultivos puros, un germen ácido-resistente, que, según ellos, es el verdadero bacilo de la lepra. La importancia de tales resultados es tan grande que, delante de afirmaciones de esa índole, la obligación se impone a los investigadores serios de buscar la verificación. Para llenar el requisito de la validez no basta una confirmación aislada, es necesario que esos resultados sean la regla. En materia de bacilos leprosos, a semejanza de lo que acontece con la espiroqueta de la sífilis, el problema es indudablemente más complicado que en tratándose de cualesquiera otras entidades microbianas. Aislar de productos seguramente leprosos un bacilo ácido-resistente, no patógeno para los animales de laboratorio y morfológicamente semejante al bacilo descubierto por Hansen, es ciertamente menos difícil que aportar la prueba definitiva de su identidad con el agente causal de la lepra. Varios hechos, fundamentales en nuestro sentir, están indicando la necesidad imperiosa de considerar con amplias reservas los resultados obtenidos hasta el día de hoy. Las descripciones propuestas por los diversos autores que han anunciado haber cultivado artificialmente el Bacilo de Hansen, lejos de concordar entre sí, presentan diferencias esenciales. Tan pronto se trata de un bacilo aerobio que pierde su propiedad de resistir a la acción decolorante de los ácidos, cuyo polimorfismo se extiende desde las formas redondas de los cocos hasta las filamentosas de los hongos inferiores; como de bacilos anaerobios que conservan en los medios artificiales su ácido-resistencia y se agrupan en *globis*, como acontece con el auténtico Bacilo leproso. Claro se ve pues que, a pesar de que todos reivindican haber aislado el *verdadero* Bacillus leprae, la mayor parte de los gérmenes cultivados bajo ese rótulo son representantes de familias bacterianas diferentes las unas de las otras. Otro punto de vista que debe tenerse en consideración es la rapidez con que tales cultivos se multiplican *in vitro*. Si se tiene en cuenta la duración del período de incubación de la enfermedad en el hombre que, para colocarnos en un término medio, es de 3 a 5 años, difícilmente pueden aceptarse las pretensiones de los autores que obtienen cultivos en el espacio de pocos días. Por lo demás, si el Bacilo de Koch sólo alcanza su desarrollo máximo al cabo de 25 a 40 días de incubación, por analogía puede pensarse que Bacillus leprae, cuya vitalidad no es de ninguna manera superior a la del primero, requiere por lo menos una permanencia igualmente larga en la estufa. Los dife-

rentes medios en que se ha ensayado este cultivo, tan variados como extensa ha sido la imaginación de los investigadores, se han ido simplificando paulatinamente, en cada uno de los casos, hasta que finalmente han sido reemplazados ya por los medios usados en el cultivo del Bacilo tuberculoso ora por los medios ordinarios empleados para las bacterias no ácido-resistentes. ¿Cómo interpretar esta acomodación progresiva de los cultivos, tan exigentes en un principio, a la vida artificial? Nuestra convicción es de que toda acomodación artificial de un microbio implica una pérdida en el campo de sus propiedades originales. Bastaríanos recordar la acción del bacteriófago, de algunas sustancias químicas, de las antitoxinas, de las aglutininas etc., sobre cultivos cuyas propiedades nos son bien conocidas, para desvanecer las dudas que pudieran surgir. En ciertas ocasiones se ha dado a título de características de los cultivos del germen hanseniano la producción de un pigmento amarillo-rojizo, semejante a la carotina. Teóricamente puede aplicarse a esos cultivos el principio, reconocido verdadero para los bacilos tuberculosos, de que la producción de pigmento está en relación inversa de la virulencia. Efectivamente, son los bacilos para-tuberculosos los que en mayor grado presentan el fenómeno. La experiencia nos enseña que no reducido número de los llamados cultivos de Bacilo leproso no son otra cosa que bacilos del grupo paratuberculoso, que forma parte de la gran familia de los ácido-resistentes. Ordinariamente se aduce como prueba de la autenticidad de un cultivo el hecho de no ser patógeno para el conejo ni para el cobayo. Esto solamente demuestra que no se trata de un bacilo tuberculoso pero la discusión queda abierta en cuanto a los bacilos ácido-resistentes saprofitos se refiere. Ha habido quien busque en las reacciones de desviación del complemento o de aglutinación, sirviéndose de antígenos preparados con los cultivos, un argumento en favor de la especificidad. Ciertamente los resultados de tales reacciones son positivos pero tratándose de sueros leprosos hay que tener en cuenta que, como lo hacíamos anotar arriba, la especificidad es una mera ilusión. Háganse con estos sueros reacciones en las que se empleen antígenos tuberculosos (Boquet y Negret, Arenas, Calmette etc.), antígenos preparados a partir del B. C. G., del Bacilo de Stefaniski, del de Clegg, del de Kedrowski o simplemente de cualquier ácido-resistente saprofito (bacilos del cerumen de los oídos, del smegma, del comedon etc.) y se obtendrá en todos los casos los mismos resultados positivos.

Estas consideraciones nos han sugerido la idea de que la solución del enigma se encontrará talvez siguiendo un camino indirecto. El bacilo de la lepra de las ratas, cuyas relaciones con el Bacilo de Hansen han señalado *Mezinescu* 88), *Alexandrescu* 89), *North* 90) y muchos investigadores más, presenta la inapreciable ventaja de ser propicio para la experimentación. Si nos hallamos en capacidad de cultivar el agente causal de la lepra marina, tres casos podrían presentarse: 1.º El bacilo de Stefaniski pierde en los cultivos en serie su poder patógeno. 2.º Los cultivos se muestran patógenos en el mismo grado que las emulsiones de órganos leproso; y 3.º En los medios artificiales el bacilo de la lepra presenta caracteres nuevos, tanto desde el punto de vista de su biología general como de su acción patógena experimental. Puede admitirse que si los cultivos del Bacilo de la lepra marina se comportasen según uno de los tres casos que hemos expuesto, fácil sería valiéndose de este punto de partida, orientar las futuras investigaciones que, en último análisis, deben aportar un fallo definitivo en la discusión de la autenticidad de los supuestos cultivos de *Bacillus leprae* tipo humano.

Mencionemos brevemente los trabajos de los cuales se desprende que, aplicando los procedimientos indicados por quienes han logrado resultados alentadores, sus autores no pudieron comprobar el desarrollo artificial del Bacilo de Hansen. Se objetará quizá que los resultados negativos carecen de valor demostrativo. No obstante, el cultivo artificial de un germen es cosa que no puede estar sujeta a semejantes irregularidades y respecto de la cual la suma de muchos resultados negativos es más elocuente que un éxito aislado, problemático y que, en el mejor de los casos, ha sido el fruto de la casualidad. Nueve años después de haber realizado el descubrimiento más trascendental que registre la leprología, en 1882, *Armauer Hansen* 91), como más tarde *Neiser* 92), planteaba el problema del cultivo artificial del germen que lleva su nombre. *Katz* 93), *Favrat* 94) y otros señalan el hecho de que *Bacillus leprae* no se desarrolla en los medios usuales de laboratorio. En 1887 aparece nuevamente en la literatura un ensayo de cultivo coronado por el éxito. *Bordoni Uffreduzzi* logra cultivar en suero peptonizado y glicerinado un germen aerobio, ácido-resistente, cuyas colonias se dejan ver desde el octavo día, a la temperatura de 35° a 37°. Dos años más tarde, *Guiaturco* 96) confirma los experimentos de *Bordoni Uffreduzzi* 96) y después de 1899 otros investigadores han dado a conocer resultados semejantes. Los es-

tudios de *Boinet* 97) merecen especial atención pues fue ese autor quien por primera vez indicó la carencia de poder patógeno de sus cultivos. Los bacilos aislados por *Boinet* se desarrollaban en agar ordinario entre 30° y 32° en seis días. *Campana* 98), en 1891, cultiva en anaerobiosis un germen no ácido-resistente pero que, después de la diferenciación por el alcohol ácido, aparecía teñido en violeta. El bacilo de *Campana* tampoco es patógeno para los animales de experimentación. Al lado de los estudios de *Ducrey* 99), *Rake* 100), *Levy* 101), *Czaplewski* 102), *Babes* 103), *Spronk* 104), *Teich* 105) y *Baranniskow* 106) que han obtenido cultivos puros sirviéndose de diferentes procedimientos, de bacilos que ellos consideran como leprosos y en los detalles de cuyos estudios sería inútil entrar, citemos las observaciones de *Kantack* 107), *Wnukow* 108), *Wolters* 109), *Doutrepoint* y *Wolters* 110), *Scholtz Klingmuller* 111) y *Deycke* 112) que, por su parte, no admiten la posibilidad de cultivar artificialmente, en las condiciones actuales de experimentación, el agente etiológico de la lepra humana. Los trabajos de *Carrasquilla* 113) sobre el cultivo del bacilo de Hansen (1899) aparecen en la literatura después de los estudios de *Spronk* y *Czaplewski* (1898), en el mismo año que los de *Babes*, *Teich* y *Baranniskow* y antes de los de *Scholtz* y *Klingmuller* (1900). Ese autor aísla de la linfa de un enfermo de lepra, en suero humano coagulado, a la temperatura de 37° y en aerobiosis, un bacilo colorable por el método de Ziel cuyo desarrollo se hace aparente desde las 24 horas. Al día siguiente de las siembras podían observarse sobre la superficie inclinada del medio dos clases de colonias diferentes: amarillas las unas, blanquecinas las otras, las unas presentaban bordes regulares, las otras bordes irisados. En ambos casos se trataba del mismo germen ácido, alcohol-resistente, morfológicamente idéntico al bacilo de la lepra. Las subculturas, en el mismo medio, poseían los caracteres observados en el cultivo inicial. Los pases en caldo no modifican ni el desarrollo ni las propiedades de los cultivos. El bacilo cultivado por *Carrasquilla* es un germen móvil, probablemente flagelado. La acción patógena experimental, que el autor no estudió en su Cuarta Comunicación (25 Feb. 1899), aparece claramente definida en su trabajo titulado "La Lepra", presentado al Congreso científico latino-americano de Río de Janeiro en 1910. En la página 123 del tomo IV de las actas y memorias de dicho Congreso se encuentra lo siguiente: "Practicamos así mismo inoculaciones en conejos con el líquido de los cultivos y logramos reproducir la infección, con los

Revista de la Facultad de Medicina.

síntomas y las lesiones que caracterizan la lepra, pero en una forma aguda que causó la muerte de los animales en poco tiempo. A la autopsia se encontró el bacilo específico en los tejidos y en los órganos de los animales muertos a consecuencia de la enfermedad producida experimentalmente". La declaración que precede, hecha espontáneamente por *Carrasquilla*, nos dispensa de comentarios.

A riesgo de aparecer monótonos, nos proponemos continuar cronológicamente, considerando las tentativas que se han hecho en el sentido de la cultivación artificial de *Bacillus leprae*. Cada una de ellas constituye un esfuerzo que sería injusto dejar inadvertido. De cada ensayo se deducen conclusiones que indudablemente precisa reunir para poder apreciar en su conjunto el estado actual de la cuestión. No es éste el lugar propicio para el estudio detallado de cada trabajo y como no es nuestra intención traer la literatura completa de la cultivación del bacilo de Hansen, nos limitaremos en la mayoría de los casos a citar los caracteres predominantes de los principales gérmenes que ha sido posible aislar de productos leprosos. *Kedrowski* (114) logró cultivar, en tres casos, en agar-extracto de placenta y en caldo peptonizado, un germen débilmente ácido-resistente que el autor identifica al bacilo de Hansen, cuya resistencia a los decolorantes desaparece progresivamente en los medios artificiales, fenómeno señalado por *Campana* (115) y posteriormente por *Serra* (116) y otros. *Karlinski* (117) se sirve de linfa humana, obtenida por punción aséptica de vejigatorios, en la cual se desarrollan del 6.º al 8.º día a 38º C., bacilos ácido-resistentes, no patógenos para los animales de experimentación y de los cuales el autor obtuvo 6 generaciones en el curso de siete meses. *Rost* (118) emplea medios pobres en cloruro de sodio, *Weil* (119) inyecta huevos y medios glicerinados, alcalinos y neutros e indica que solamente en las formas tuberculosas de la enfermedad hay probabilidades de obtener cultivos positivos. *Clegg* (120) (121) cultiva el bacilo de la lepra en simbiosis con amibas y *Vibriones* coléricos, en el medio de *Musgrave*. La calefacción a 60º durante media hora destruye las impurezas que abundan en el cultivo. Los bacilos ácido-resistentes no sólo soportan esa temperatura sino que después de calentados se desarrollan en los medios usuales de laboratorio. Este germen es patógeno para el cobayo, en el organismo del cual logró hacer el autor inoculaciones en serie. *Duval* (122) confirma los trabajos de *Clegg* y cultiva el bacilo de la lepra en contacto con los bacilos de la influenza, tíficos, disentéricos, los meningo-

cocos etc., entre 25° y 28° C. Valiéndose de sueros anti-fuertemente líticos es fácil obtener puro el germen Ziel-Nielsen positivo. Inoculado al ratón *bailarin* del Japón, el bacilo de Duval, como lo había mostrado *Sugai* con respecto del bacilo de Hansen, provoca una infección generalizada del animal. Los demás animales de laboratorio se muestran insensibles. Los ácidos aminados, los productos de digestión triptica—señala *Duval*—favorecen el desarrollo de tal manera que podría usarse con buenos resultados la gelosa adicionada de suero humano y de tripsina. *Twort* (123) ha utilizado un medio compuesto de bacilos tuberculosos muertos (100°), glicerina, huevos y cloruro de sodio. Este medio, solidificado por coagulación de la ovoalbúminina, sería propicio para la cultura de *Bacillus leprae*. *Williams* (124) cultiva un *Streptotrix* gran negativo y no ácido-resistente, semejante al de *Deicke* pacha, que el autor asimila al bacilo de *Rost* (125), toda vez que las diferencias que separan los dos gérmenes no tienen mayor importancia. Conviene hacer mención de los importantes estudios de *Bayon* (116) *Currie*, *Brinckerhoff* y *Hollmann* (127) *Currie*, y *Hollmann* (128), de los cuales nos ocuparemos más adelante. *Marchoux* (129) considera como condición indispensable para la pululación *in vitro* de *Bac. leprae* un pasaje por el organismo de la rata. En efecto, si se inyecta moco nasal de un leproso por vía subcutánea a una rata, se ve aparecer en el tejido celular-subcutáneo un verdadero cultivo de gérmenes ácido-resistentes que, sembrados en un tubo ordinario de cultivo, se multiplican con relativa facilidad. *Martínez Santamaría* (130), a cuya memoria queremos rendir nuestro homenaje de admiración, cultivó en 1913, a partir de los tejidos de un animal previamente inyectado con emulsiones de bacilo leproso, un elemento filiforme que, en el curso de los pasajes, adquirió marcadas propiedades ácido-resistentes. En otros casos (131) ha sido posible cultivar, partiendo de material leproso, diferentes bacilos cuyos caracteres morfológicos podríamos resumir así: 1. Bacilos ácidos-resistentes, que forman colonias amarillas o anaranjadas, semejantes al tipo *Clegg*; 2. Bacilos difteroides análogos al de *Kedrowski*; 3.° Bacilos ácido-resistentes, anaerobios, tipo *Ducrey-Campana* y 4.° Bacilos ácido-resistentes desprovistos de pigmento, tipos *Karlinshi*, *Duval* etc. Se ha indicado asimismo la cultura, en gelosa-placenta y gelosa-extracto de pescado, de una *Nocardia* que no retiene los colorantes después de la diferenciación por los ácidos, pero se adquiere esa propiedad a los seis meses de vida artificial. Un año después del cultivo inicial, se

ven aparecer las primeras formas bacilares ácido-resistentes. *Johnston* 132) piensa que el bacilo leproso es una forma ácido-resistente de un *Streptotrix* poliformo. Para otros autores puede obviarse la dificultad que presenta el cultivo inicial inoculando los productos leprosos en la cámara anterior del ojo del conejo, donde se forma, a veces, un nódulo rico en bacilos que luégo es posible cultivar *in vitro* 133). Digamos sin embargo que nada permite sostener la especificidad de tales nódulos. En suero de buey glicerinado *Kohda* 134) y en diferentes medios a base de glicerina (*de Sousa-Araujo* 135) se ha logrado cultivar elementos baciliformes, Ziel positivos que, en las observaciones de *de Souza-Araujo*, desaparece poco a poco dejando tras sí una forma filamentosa, el *Actinomices lepromatis*. *Sihga* 136) introdujo la papa glicerinada, neutra o ligeramente alcalina, como medio posiblemente favorable para el desarrollo del bacilo de Hansen. Después de él numerosos son los investigadores que han recurrido a ese medio. Afortunadamente la opinión de los bacteriólogos es bien clara respecto de este asunto. Verificando los experimentos de *Shiga*, *Marchoux* 137) *de Souza-Araujo* 138) y otros indican que sólo se trata de una conservación de los bacilos, sin que haya multiplicación evidente. En gelosa adicionada de ácido oleico, dextrina y una solución glicerinada de cocción de huevo, *Wherry* 139) ha podido aislar un bacilo-resistente de la sangre proveniente de lesiones leprosas. Los bacilos cultivados por *Wherry* son finos bastoncillos granulosos que pierden el tinte rojo del Ziel cuando se diferencian las preparaciones por el alcohol-clorhídrico. Los cultivos se desarrollan en mejores condiciones cuando se reemplaza el oxígeno por gas carbónico en la atmósfera de la estufa. Siguiendo exactamente la técnica descrita por *Wherry*, *Oliver*, *de León* y *de Roda* 140) no obtuvieron ningún resultado satisfactorio. El medio de Hohn, modificado por adición de verde de malaquita, permitió a *Sonnenchein* 141) observar, dos meses después de la siembra, una débil multiplicación del bacilo leproso, cuyas re- siembras en el mismo medio fueron más abundantes. *Vaudremer*, *Sezary* y *Brun* 142) en un medio que ellos llaman de "Aspergillus Fumigatus" y que es en realidad un cultivo de *Aspergillus* filtrado por bujía, obtienen cultivos de un germen ácido-resistente que, en el curso de los pasajes, pierde esta propiedad y presenta un polimorfismo que se extiende desde las formas meningococcicas no ácido-resistentes hasta las formas típicas, bacilares granulosas, Ziel positivas etc., de *Bacillus leprae*. "La fase ácido-resistente no se obtiene sino después de

una serie de mutaciones (formas meningococcicas gram positivas, bacilar cianófila y granulosa, bacilar esporulada y en fin bacilar ácido-resistente) que comportan un ciclo cuya evolución puede durar de diez a veinticuatro meses". Con los trabajos de *Ota* y *Sato* 143), que en 1931 anunciaron haber obtenido por hemocultivo, en los medios de Petraghani, Petroff y Loewenstein, cultivos puros del bacilo de Hansen, se entra en una nueva e interesante fase de los pacientes estudios que en este trabajo hemos ensayado de bosquejar. Efectivamente, es lícito pensar que un bacilo ácido-resistente, aislado de la sangre de un leproso, en plena evolución de la enfermedad, es un germen patógeno. En otros términos, a primera vista puede darse como argumento de especificidad el hecho de que esos cultivos se han realizado directamente de la sangre circulante de un hanseniano. El valor de este argumento, al cual sólo se rendiría un experimentador poco avisado, en materia sobre la cual nos volveremos a ocupar. Digamos para completar la observación de los autores japoneses que, en las condiciones en que ellos trabajaron, pudieron observar 6 veces colonias de un *Micobacterium aurianticum* y 3 veces las de un *Micobacterium album*. El tipo anaranjado se mostró patógeno para las ratas blancas, que presentan, al decir de los autores, lesiones completamente diferentes de las de la tuberculosis. *Mac. Kinley* y *Soule* 144) obtienen, en papa glicerizada y en los medios de Dorcet y de Petroff, cultivos de un bastoncillo ácido-resistente que produce en el *Macaco rhesus* lesiones nodulares de tipo granulomatoso. Los cultivos fueron hechos bajo una atmósfera que contenía 10 por 100 de CO₂ y 40 por 100 de O₂. A medida que aumenta el número de repiques, disminuye la virulencia del bacilo que, después del pasaje décimoprimeros se mostró incapaz de determinar las lesiones granulomatosas observadas anteriormente. *Lepine*, *Marquianos* y *Papayouanou* 145) repiten los experimentos de *Ota* y *Sato*, siguiendo estrictamente la técnica de Loewenstein, pero, contrariamente a los autores japoneses, no logran obtener el cultivo del bacilo leproso. En la mayor parte de los enfermos (lepra tuberosa) cuya sangre estudiaron *Lepine* y sus colaboradores, la bacilemia había sido comprobada por examen directo de la sangre. Trabajando en condiciones idénticas a las indicadas por *Ota* y *Sato* y seguidas por los trabajadores del Instituto Pasteur de Atenas, *Watanabe* y *Harasawa* 146) 147) obtienen en un 25,7% de los casos cultivos de bacilos ácido-resistentes, desprovistos de poder patógeno pero que, según declaran los autores

mismos, *no tienen ninguna relación con el bacilo de Hansen*. Ignorando los trabajos precedentemente citados, Lleras 148) aísla de la sangre de hansenianos (forma tuberculosa), por el método de Loewenstein, en medio de Petragani, un germen ácido-resistente, móvil, que se desarrolla al cabo de seis a diez días de incubación, formando colonias húmedas del tipo S y un pigmento amarillo, anaranjado. La inoculación al cobayo no fue seguida de reacciones apreciables. En algunos velos de los cultivos en caldo glicerinado, se encontraron formas filamentosas no ácido-resistentes que el autor considera como un posible lazo de unión entre el bacilo de la lepra y los hongos. Estas formas atípicas, resemebradas en el medio de Petragani, dan origen a formas bacilares ácido-resistentes cuyos caracteres corresponden exactamente a los del germen aislado primitivamente.

Espontáneamente se presenta al espíritu la misma pregunta que nos hacíamos hace un momento: ¿Son estos cultivos o por lo menos algunos de ellos, verdaderos cultivos del auténtico bacilo de Hansen? Ya tuvimos ocasión de hacer notar las dificultades que debe obviar quien pretenda dar una solución satisfactoria a esta cuestión. Aunque ése no es nuestro objetivo, no quisiéramos terminar estas líneas sin dar a conocer algunas particularidades de cada una de las diez y ocho razas de bacilos aislados de productos leproso, que hemos tenido oportunidad de examinar. Asunto controvertido es el de la ácido-alcohol resistencia de los cultivos de que tratamos. No son pocos los autores que se han pronunciado en favor de la tesis de que, en la vida artificial el bacilo leproso pierde poco a poco su capacidad de resistencia a los agentes de coloración. Nosotros consideramos que siendo esa propiedad un fenómeno parcialmente dependiente de la composición química de la envoltura de los llamados gérmenes ácido-resistentes, la pérdida de esa propiedad no puede explicarse sino mediante una modificación del protoplasma bacilar. Pero como la envoltura o cápsula cérea es precisamente uno de los factores de vitalidad que mejor conocemos en *Bacillus leprae*, es lógico suponer que los bacilos cuya ácido-resistencia *ha desaparecido* son elementos degenerados, elementos de menor resistencia. Eso no es todo, sabido es que si, como se ha anotado en repetidas ocasiones, tratamos el bacilo de Koch por uno de los solventes habituales de las substancias céreas, la ácido-resistencia persiste pues este fenómeno no solamente está ligado a la envoltura bacilar sino que es debido principalmente a un equilibrio físico-químico especial del protoplasma. Si

5. Colonias blancas, rugosas y secas . Levy-Ch.
6. Colonias carmelito-rojizas, rugosas y secas. Noeedham.
7. Colonias anaranjadas, rugosas y húmedas. Duval.
8. Colonias anaranjadas, rugosas húmedas y secas Duval-Ch., Celgg 1, Brinckerhoff 1, Currie, "18", Clegg 2.
9. Colonias anaranjadas, lisas, y húmedas. Lleras.

Todos estos bacilos se desarrollan abundantemente en los medios usados para el bacilo tuberculoso, en caldo y agar glicerizados o adicionados de suero de buey y algunos de ellos aun en los medios ordinarios de laboratorio. Ninguno, a excepción del bacilo aislado por *Lleras*, cuyo estudio apenas iniciamos, se ha mostrado patógeno para los animales de experiencia (conejo, cobayo, ratas y ratoncitos blancos, y monos, *Macacus Rhesus*).

Kendall, Day y Walker (150) han anotado que el bacilo de Duval no participa de los fenómenos metabólicos que caracterizan el bacilo de Koch y que, aunque en menor intensidad, han sido observados en los bacilos del smegma y de las gramíneas. Estudiando las razas *Kendrowsky*, *Clegg 1 y 2*, *Binckerhoff 1 y 2*, *Rost-Williams*, *Duval, 18*, *Currie y Levy-Chrome*, *Kondo* (151) (152) concluye que esos gérmenes, bien que diferentes del bacilo tuberculoso, no pueden separarse de una manera definitiva de los demás bacilos ácido-resistentes y especialmente de los saprofitos. Tanto desde el punto de vista de la asimilación del carbono, como del nitrógeno y de las sales minerales, las diferentes razas cultivadas de casos de lepra se comportan como el *Timithé Bacillus* y de manera más o menos análoga al bacilo de *Friedman*, aislado de las tortugas. De todas maneras entre estas razas existen diferencias apreciables. En tanto que el bacilo de *Rost y Williams* se acerca por su metabolismo de los bacilos ácido-resistentes saprofitos, el tipo *Nabarro-Bayón* forma el otro extremo de la gama aproximándose de los bacilos patógenos para los animales de sangre caliente. Entre estos dos límites se agrupan los dos gérmenes estudiados por *Kondo*. Si observamos con *Aoki* (153) la avidez de estos microbios por el oxígeno, comparativamente con otros de la familia ácido-resistente, veremos que al paso que los bacilos tuberculosos, los de la lepra murina y los del smegma (que representan en este caso las

especies patógenas) se conforman con cantidades muy limitadas de O₂, las razas llamadas “cultivadas” de *Bacillus Leprae*, el Timothé *Bacillus* y el B. C. G. (estos dos últimos representan las especies no patógenas), en cambio, exigen cantidades sensiblemente superiores a las requeridas por los primeros.

Para terminar, volvamos a considerar los casos en que el bacilo cultivado ha sido aislado de la sangre circulante de enfermos de lepra. Decíamos que los hemocultivos podían, a primera vista, hacer creer en la especificidad de tales bacilos. Ahora nos proponemos demostrar que el hecho de que los bacilos hayan sido aislados de la sangre de un leproso no implica mayor seguridad que si el aislamiento se hubiera hecho a partir de un leproma, de la linfa etc. El método de Lowestein, que sin duda constituye un progreso en la bacteriología de la tuberculosis, está lejos de corresponder a las esperanzas que en un principio pudo haber hecho concebir. La experiencia nos ha enseñado que el hemocultivo en la tuberculosis no se logra con la frecuencia indicada por el autor vienés y que un conjunto de causas de error, que conviene no desconocer, complica aun más la interpretación de los resultados obtenidos con ese procedimiento. Nos abstenemos de insistir sobre el particular y remitimos al lector a las revistas de tuberculosis, donde encontrará las indicaciones a que aludimos. Mencionamos solamente las recientes investigaciones de *Popper* (154, que ha practicado, en el espacio de tres años, 6.000 hemocultivos por el método de Loewestein.

Citaremos sólo los resultados obtenidos en 300 casos de tuberculosis pulmonar: sólo 4 veces (1,33%) fue posible cultivar, partiendo de la sangre, el bacilo de Koch, a pesar de que los ensayos se repitieron varias veces y de que en 16 casos fue dable observar microscópicamente bacilos ácido-resistentes en la sangre (gota espesa); 6 veces (2%) se cultivó, en las mismas condiciones, un germen ácido-resistente que se desarrolla rápidamente en los medios artificiales, dando colonias amarillas y húmedas, del tipo S. Este germen no es patógeno para los animales de laboratorio y presenta marcada vitalidad, es el *Micobacterium luteum*. Ya en 1913 había señalado *Tiedeman* (155) la *presencia en la sangre de individuos normales de un bacilo ácido-resistente*, del grupo de los paratuberculosos, productor de pigmento y cuyo paso a la circulación no estamos en capacidad de explicar. Resultados semejantes han obtenido *Legezynsky Ostrowski* (156), *Marchesani* (157), *Norton* y *Broom* (158), *Popper*, *Bodart* y *Schindler*, *Schwa*-
Revista de la Facultad de Medicina.

bacher 160) y otros. Claro se ve que si, como se deduce de lo dicho, pueden hallarse en la sangre humana circulante, en regiones indemnes de lepra entidades bacterianas ácido-resistentes independientes del bacilo de Koch, nada autoriza para sostener que los bacilos aislados en análogas circunstancias, de la sangre de los leprosos, son realmente idénticos al bacilo de Hansen. Por el contrario, todo está indicando que en tales casos se trata de gérmenes saprofitos.

En el estado actual de nuestros conocimientos, no es posible establecer un límite entre los supuestos bacilos leprosos a que nos hemos referido y los bacilos morfológicamente análogos, del grupo denominado paratuberculoso. Es que, aun admitiendo que esos ensayos fueran posibles, en este caso no es posible llenar el postulado de Koch. Reproducir experimentalmente la lepra en el hombre o en los animales es otro de los problemas insolubles que la enfermedad nos plantea. Los dolorosos acontecimientos acaecidos en Lubeck a principios de 1930, que todos tenemos presente, debían enseñarnos que, a pesar de que las infecciones fueron nocivas, la tuberculosis experimental no se obtiene en el hombre con la facilidad que fuera de suponer. En efecto, de 251 niños *vacunados* (con la mortal mezcla de bacilos tuberculosos humanos y B. C. G.) 69 murieron a causa de tuberculosis por ingesta, es decir, que la mortalidad fue de 27,49%, que relativamente es un porcentaje muy bajo. Por lo demás, si tenemos en cuenta la duración del período de incubación de la lepra en el hombre, tendremos que convenir que muy posiblemente permanecerían infructuosas las tentativas que se hicieran en este sentido.

De las consideraciones anteriormente expuestas podemos sacar las siguientes conclusiones:

a) Los gérmenes cultivados a partir de productos leprosos pertenecen, en la gran mayoría de los casos, a especies o variedades bacterianas diferentes las unas de las otras.

b) Esos bacilos, además de la carencia de poder patógeno experimental, se diferencian netamente de los bacilos tuberculosos (humano, bovino y aviario) por sus caracteres culturales y metabólicos.

c) Todos esos bacilos se desarrollan en los medios artificiales más rápida y más abundantemente que el bacilo de Koch.

d) Por su avidez de oxígeno, su metabolismo general y la producción de pigmentos se acercan más al grupo de los ácido-resistentes saprofitos que al de los patógenos.

e) En el estado actual de nuestros conocimientos no es posible es-

tablecer, directamente y de una manera definitiva, las relaciones que cada uno de esos gérmenes pueda tener con *Bacillus leprae* humanus, ni, por el contrario, las diferencias que los separen.

BIBLIOGRAFIA

- Carrasquilla J. de D.* — a) Communication a l'Academie Nat. de Med. de Bogotá. Séance du 30 Aout. 1895.
b) *ibid.* Séance du 22 Nov. 1895.
c) Comunicación presentada a la Acad. Nac. de Med. de Bogotá el 24 de junio de 1896.
d) Leprakonferenz, Berlín, 1, 81, 1897.
e) Com. a la Acad. de Med. de Bogotá, séance du 25 Febr. 1899.
f) "La Voz de Job", S. 1, N.º 3; *ibid.* Nos, 4, 5, 6 y 7, 1904-1905.
g) Congresso Scientifico Latino-Americano. Relatorio Geral., IV, Livro B, 93, 6 a 16 agosto de 1905, Rio de Janeiro.
- 1) *Serra* — Boll. Soc. Sci. Med. e Nat. in Cagliari, año XV, N.º 3, 1910.
2) *de Beurmann, Vaucher et Laroche.* Bull. Soc. Méd. Hop. 24 Juin 1909.
2a *Franchini* — Arch, ital. Sci. Med. col. IX, 643, 1928.
2b) *Markianos* — Ann. Dermat. et Syph. IV, 220, 1933.
2c) *Marchoux*—2.e Conférence de la lépre, Strassburg, 111, 57, 1912.
3) *Wise* — Jl. London Sch. Trop. med., 1, N. 3, 251.
4) *Lagane*— Bull. Soc. path. exot., V, 1912 y C. R. Soc. Biol. LXXIV, 1913.
5) *de Beurmann et Gougerot* — Lepra, XIV, N.º 2, 73.
6) *Sugai* — Zbl. f. Bak. 1 Ord., LXVII, 1912.
7) *Babes* — 2e. Conférence de la lépre, Strassburg, 111, 321, 1912.
8) *Gougerot* — Lepra, XIII, 211.
9) *Bourret* — Buil. Soc. path. exot. citada en Bull. Inst. Pasteur, VI, 778.
10) *Lagane et Colombier* — Bull. Soc. path. exot., VI, 418, 1913.
11) *Leger* — C. R. Soc. Biol., LXXX, 217, 1921.
12) *Sadi de Buen* — Bol. Inst. nac. Hig. Alfonso XIII, XII, 227, 1916.
13) *Ranzi* — Wien. Klin. Woch., XIX, 1552, 1906.
14) *Eitner* — Wien. Klin. Woch., XIX, 1515, 1906.
- Revista de la Facultad de Medicina.

- 15) *Wechselmann u. Meier*—Deut. med. Woch., 23, Juli 1908, p. 1340.
- 16) *Eitner* — Wien. klin. Woch., XXI, 729.
- 17) *Pasani* — L'Ospedale Maggiore, IV, 1909.
- 18) *Frugone u. Pisant* — Berlin med. Woch., 16 Aug. 1909, p. 1530.
- 19) *Babes e Busila* — C. R. Soc. Biol., LXVII, 181.
- 20) *Michaelides* — Lepra, XII, N.º 4.
- 21) *Lloyd, Muir a. Muitra* — Ind. Jl. med. Res., XI, N.º 5, 1923.
- 22) *Slatineano et Danielopol* — C. R. Sec. Biol., LXVI, 332.
- 23) *Recio*— Sanidad y Beneficencia (La Habana), 11 Sep. 1909.
- 24) *Ehlers et Bourret* — Bull. Soc. path. exot., 11 Nov. 1909, p. 520.
- 25) *Thomsen u. Bjarnhjedinson* — Lepra, IX, 4 Dec. 1910.
- 26) *Eliasberg* — Deut. med. Woch., 4 Nov. 1909, p. 1922.
- 27) *Biehler u. Eliasberg* — Lepra, IX, N.º 4, 1910.
- 28) *Steffenhagen* — Berlin kli. Woch., N.º 29, 18 Juli 1910.
- 29) *de Haan u. Grijns* — Geneesk. Tijdschr. med. Indie, f. 4, 1910.
- 30) *Schueffner* Zeitschr. f. Hyg., LXXII, 362, 1912.
- 31) *de Brilo Fontes* — C. R. Soc. Biol., LXXXVII, 331, 1912.
- 32) *Otero Morales* — Porto Rico Health Rev., 11, Nos. 5, 6 y 7, 1927.
- 33) *Lloyd* — India med. Gaz., LXIII, 173, 1928.
- 34) *de Silva Araújo* — A Folha Medica, IX, 120, 1928.
- 35) *Margaret et Deveze* — Ann. Dermat. e Siph., IX, 576, 1918.
- 36) *Van den Branden* — Ann. Soc. belge méd. trop., V, N.º 2, 1926.
- 37) *Pais* — Giorn. ital. Dermat. e Sifil., LXVIII, f. I. 1927.
- 38) *Nojima* — La lepro, N.º 1, marzo 1930, p. I.
- 39) *Eliasberg* — Deut. med. Woch. 16 Fev. 1911, p. 302.
- 40) *Lewis a. Aronson* — Jl. Infec. Dis., XXXVIII, 219, 1928.
- 41) *Jeanselme* — Presse Médicale, 27 Juillet 1912.
- 42) *Rocamora* — Lepra, XIII, f. I.
- 43) *Banciu* — C. R. Soc. Biol., XCII, 531, 1925.
- 44) *Capelli*—Giorn. ital. mal. ven. e pelle, XLIV, 545, 1923.
- 45) *Area Leao* — Mem. Inst. Oswaldo Cruz, XVI, 47, 1923.
- 66) *Wade* Philippine Jl. Sci., XXX, 59, 1916.
- 47) *Matefy* — Deut. med. Woch., N.º 21, 1923.
- 48) *Marras* — Rev. Suramericana, IX, 1132, 1926.
- 49) *Girard et Robic* — Bull. Soc. path. exot., XXI, 187, 1928.
- 50) *Lai a Wang-Lai* — China med. Jl., XLII, 880, 1928.
- 51) *Leger* — Rev col. méd. et chir., 15 Sep. 1930 y Bull. Soc.; 25, 128, 1932.

- 52) *Sanjurjo* — Bull. Soc. path. exot., XXX, 1927, 1932.
- 53) *Duncombe* — Trans. R. Soc. Torp. med. a. Hyg., XX, 512, 1927.
- 54) *Gilbert, Tzanck et Cabanis* — C. R. Soc. Biol., XCIV, 837, 1926.
- 55) *Landeiro* — C. R. Soc. Biol., XCV, 1261, 1926.
- 56) *Labernadie et André* — Bull. Soc. Pat. exot. XX, 839, 1927.
- 57) *Rubiño* — C. R. Soc. Biol., XCVI, 225, 1927.
- 58) *Muir* — India Jl. med. Res., XVI, 135, 1928.
- 59) *Marchoux et Caro* — Ann. Inst. Pasteur, XLII, 542, 1928.
- 60) *Markianos* — Bull. Soc. Path. Exot., XXII, 152, 1929.
- 61) *Policaro* — Dermosifilgrafo, VII, N.º 5.
- 62) *Peltier* — Bull. Soc. Path. exot., XXI, 836, 1928.
- 63) *Moses* — Rev. med. Sao Paolo, XIII, N.º 9. 1910.
- 64) *Parras* — Philipinne Jl. Sci., XXX, 219, 1926 e idem XXXII, 155, 1927.
- 65) *Gómez, Leiter y Vancolle* — Inst. Hyg. Sao Paolo, XXVI, 1928 y Rev. Biol. e Hyg., N.º 2, 1928.
- 66) *Currie a. Clegg* — Publ. Healt. Bull., N.º 50, 1911.
- 67) *Metchnikoff et Besredka* — cit. de A. Besson, Tech. Microb. Serother. 111, 1154, 7.^a edition, 1924, Paris.
- 68) *Friedberger u. Hartoch* — Zeitschr. f. Immunitaetsf., 111, 581, 1909.
- 69) *Sleewig* — cit. de Richet, L'Anaphilaxie, p. 178.
- 70) *Doerr u. Russ* — Zeitschr. Immunitaetsf., 111, 109, 1909 e idem. 111. 181 y 706, 1909.
- 71) *Friedmann* — Zeitschr. f. Immunitaetsf, 11, 591. 1909.
- 72) *Doerr u. Moldovan* — Zeitschr. Immunitaestf., V, 125, 1910.
- 73) *Richet* — L'Anaphilaxie, librairie Félix Alcan, p. 237, 1923, Paris.
- 74) *Muir* — India Jl. med. Res., XV, N.º 2. 497.
- 75) *Franca* — Arch. R. Inst. Bac. Camara Postana, 11, 53, 1907.
- 76) *Grillo* — Zbl. f. Bakter. 1 Ord., CXXXVIII, 252, 1933.
- 77) *Krumeich u. Grillo* — Zbl. f. Bakter. 1 Or., im Druck.
- 78) *Schlossberger y Grillo*—Paidoterapia, XII, 141, 1933.
- 79) *Kroo u. von Jancso* — Zbl., f. Bakter. 1 Ref., Cl. 455, 1931.
- 80) *Hassko* — Zbl. f. Bakter. 1 Or., CXXII, 140, 1931.
- 81) *Kawamura* — Zbl. f. Bakter. 1 Ord., CXX, 120, 1931.
- 81a) *Sauerbruch u. Herrmannsdorfer*—Munchner med. Woch., LXXV, 1928.
- 82) *Correa Netto* — Brazil Medico, XXXVII, 315, 1923.
- 83) *Fujiwara* — Trop. Dis. Bull., XXVI, 623, 1929.

- 84) *Sharp* — Trop. Dis. Bull., XXV, 648, 1928.
- 85) *Grillo* — cit. de Schlossberger, Zbl. f. Haut. u. Geschlechtskrankheiten, XLIII, 374, 1932.
- 86) *Grillo u. Krumeich* — Zbl. f. Bakter., 1 Or., im Druck.
- 87) *Pinard, Rabut, Giraud et Abriscosoff* — Bull. Soc. franc. Dermat. et syphiligr., N.º 7, 648, 1929.
- 88) *Mezinescu* — C. R. Soc. Biol., LXIII, 514, 1908.
- 89) *Alexandrescu* — Tesis de Jassi, Rumania, 1908.
- 90) *North* — Health Jl. Commonwealth Dep. of Health, Australia, VIII, 67, 1930.
- 91) *Hansen* Virchow's Arch., XC, 542, 1882.
- 92) *Neisser* — Virchow's Arch., CIII, 355, 1886.
- 93) *Kats* — Proc. Linnean Soc. of New South States, IV, 19th. May 1889.
- 94) *Favrat u. Christmann* — Zbl. f. Bakter., X, 1891.
- 95) *Bordoni-Uffreduzzi* — Zbl. f. Bakter., 11, 300, 1887.
- 96) *Gianturco* Com. all Assoc. di Nat. e Med. 25 Giugno 1889, ver Zbl. f. Bakter., VI, 702, 1889.
- 97) *Boinet* — Rev. de med., X, 609, 1890.
- 98) *Campana* — La Riforma Med., N.º 14, 159, 1891; idem 1889, ps. 243 y 244 y Zeitschr. f. Hyg., LXXVI, 361, 1910.
- 99) *Ducrey* — Giorn. ital. mal. vener. ae pelle, XXVII, 76, 1892.
- 100) *Rake* — New York med. Record, XLIV, 705, 1893; The British med. Jl., 1888.
- 101) *Levy* — Arch. f. Hyg., XXX, 168, 1897.
- 102) *Czaplewski* — Zbl. f. Bakter., XXIII, 97, 1898.
- 103) *Babes* — Zbl. f. Bakter., XXV, 125, 1899.
- 104) *Spronk* — Zbl. f. Bakter., XXV, 257, 1899.
- 105) *Teich* — Zbl. f. Bakter., XXV, 756, 1899.
- 106) *Barannikow* — Zbl. f. Bakter., XXVI, 113, 1899; y XXVII, 709, 1900.
- 107) *Kanthack a. Barclay* — Brit. med. Jl., N.º 1588, 1222; N.º 1590. 1330 y N.º 1600, 476, 1891.
- 108) *Wnukow* — Zbl. f. Bakter., XII, 783, 1892.
- 109) *Wolters* — Zbl. f. Bakter., XIII, 469, 1893.
- 110) *Doutrelepont u. Wolters* — Arch. f. Cermat. u. Syph., XXXIV, 1896.
- 111) *Scholtz u. Klingmueller* — Intern. Leprarch., Heft. 3, 93, 1900.
- 112) *Deycke* — V. Intern. Dermat. Kongr., 1, 385, 1904.

- 113) *Carrasquilla* — Zbl. f. Bakter., XXVI, 385, 1899.
- 114) *Kędrowski* — Zeitschr. f. Hyg. u. Inf., XXXVII, 52, 1901.
- 115) *Campana* — 11. Intern. Dermat. Kongr., Wien 1892 en Zbl. f. Bakter., XVI, 374. 1894.
- 116) *Serra* — Com. Soc. ital. Dermat. s sifil., 20 a 23 Dic. 1909 en Bull. Inst. Pasteur, VIII, 741.
- 117) *Karlinski* — Verhandl. d. VIII. Kongr. d. deutschen dermat. Gesellschaft. zu Serajewo, 21-23 Sep. 1903.
- 118) *Rost* — Brit. med. J., N.º 2302, 1905.
- 119) *Weil* — Ann. Inst. Pasteur, XIX, f. 12, 1905.
- 120) *Clegg* — Philippine J. Sci., IV, 77 y 403, 1909 y Publ. Health Bull., N.º 75, 1916.
- 121) *Currie, Clegg a. Hollmann* — Publ. Health Bull., N.º 47, 1911.
- 122) *Duval* — Jl. exper. med., XII, 649, 1911; idem XIII, 365 y 374 1911 e ibidem XIV, 181, 1911.
- 123) *Twort* — Proc. R. Soc. B., LXXXIII, Nov. 1910, p. 156.
- 124) *Williams* — Sc. mem. by off. med. an. San. Dep. of the Gov. of India, N.º 42, 23, 1911 y Lepra XII, 131, 1912.
- 125) *Rost* — Sc. mem. by off. med. an. San. Dep. of the Gov. of India, N.º 42, 23, 1911.
- 127) *Bayón* — Ann. Trop. med. a. Parasit., IX, 535, 1915 y lepra, XIV, 187, 1914.
- 127) *Currie, Brinckerhoff a. Hollmann*—Publ. Health rep. XXV, 1173, 1910.
- 128) *Currie a. Hollmann*—Lepra, XIII, 23 y 71, 1912 y Publ. Health Bull., N.º 50, 1912.
- 129) *Marchoux* — Bull. Soc. Path. exot., IV, 89, 1911.
- 130) *Martínez Santamaría* — Jl. Torp. med. a. Hyg., XVI, 301, 1913.
- 131) *Wolbach a. Honeij*—Jl. med. Research, XXIX, 367, 1914 y XXX, 1, 1914.
- 132) *Johnston* — Philippine J. Sci., IX, 227, 1914.
- 133) *Stanziale* — Ann. Trop. med. o. Parasit., X, 165, 1916.
- 134) *Kohda* — Kitasato Arch. f. expert. med., IV, 141, 1921.
- 135) *de Sousa-Araujo* — Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Supl. 4, 142, 1928.
- 136) *Shiga* — Acta medicalia in Keijo, XII, 72, 1929 y Zbl. f. Bakter., 1 Or., CXIV, 511, 1929.
- 137) *Marchoux* — Paris Médical, 21e. année, N.º 23, 529. 1931.
- 138) *Souza-Araújo* — C. R. Soc. Biol., CXI, 331, 1932.

- 139) *Wherry* — Jl. Inf. Dis., XLVI, 263, 1930 y Philippinne Jl. Sci., XLIII, 577, 1930.
- 140) *Oliver, de Leon a. de Roda* — Philippinne Jl. Sci., XLVI, 611, 1931.
- 141) *Sonneschein* — Zbl. f. Bakter., 1 Or., CXVII, 284, 1930.
- 142) *Vaudremer, Sezari et Brun* — C. R. Soc. Biol., CVI, 1225, 1931; idem CIX, 624, 1932 y Presse Médicale p. 358, 1932.
- 143) *Ota et Sato*—C. R. Soc. Biol., CVII, 1062 y 1064, 1031 e idem CIX, 29, 1932.
- 144) *Mackinley a. Soule* — Jl. Amer. med. Ass., XCVIII, 361, 1932; ver Soule a. Mckinley: Jl. Trop. med., XII, 441, 1932.
- 145) *Lepine, Markianos et Papayoannou* — C. R. Soc. Biol., CXII, 845, 1933.
- 146) *Watanave, Harasawa a. Ono* — Kitasato Arch. exper. med., VIII, 303, 1931.
- 147) *Watanave a. Harazawa* — Kitasato Arch. exper. med. X, 87, 1933.
- 148) *Lleras Acosta* — Rev. Fac. Med. Bogotá, 1, 929, 1933.
- 149) *Aoki* — Zeitzchr. d. med. Gesell. Nagasaki, VII, 1002.
- 150) *Kendall, Day a. Walker* — Jl. Inf. Dis., XV, 439, 1914.
- 151) *Kondo* — Zeitschr. f. Hyg., CIV, 714, 1925.
- 152) *Kondo a. Nodake* — Zeitschr. f. Hyg., CV, 67, 1926.
- 153) *Aoki* — La lepra, III, N.º 3, 1932.
- 154) *Popper* — Klin. Woch., 12, Jahrgang, 1650, 1933.
- 155) *Tiedemann* — Zbl. f. Bakter., 1 Orig., CXXII, 483, 1931.
- 156) *Legezynsky et Ostrowski* — R. C. Soc. Biol., CXI, 1023, 1933.
- 157) *Marchesani* — Klin. Woch., XI, Jahrgang, 1921, 1932.
- 158) *Norton a. Broom* — Jl. Bact., XXV, 98, 1933.
- 159) *Popper, Bodart u Schindler*—Arch. path. Anat. Physiol. CCLXXXVI, 615, 1932.
- 160) *Schwabacher*—in Tuberculous Bacilaemia bx G. S. Wilson, Special Report Series N.º 182 of the Medical Research Council, London, 1933 (Appendix A).

