

ESTUDIOS BACTERIOLOGICOS Y EXPERIMENTALES DE UN GERMEN AISLADO EN UNA EPIDEMIA DE BARTONELLOSIS EN EL DEPARTAMENTO DE NARIÑO (COLOMBIA) (1)

Dr. Bernardo Samper. — Dr. Juan Antonio Montoya C.

En atención a que la epidemia de Bartonellosis, diagnosticada como tal por el Profesor Luis Patiño Camargo, revestía caracteres que afectaban seriamente una parte de la población de algunas regiones del Departamento de Nariño, deseoso el Instituto Nacional de Higiene Samper & Martínez de intervenir en su estudio, gestionó ante el Ministerio de Trabajo, Higiene y Previsión Social, el envío del doctor Juan Antonio Montoya, médico jefe de la Sección de Epidemiología de dicha Institución, a integrar la comisión (2) que había salido a hacer estudios en el mencionado Departamento; en el mes de septiembre de 1939.

El material estudiado fué conseguido, una parte por la citada comisión, en septiembre de 1939, y la otra enviada por el doctor Raúl Jaramillo, Director del Hospital de La Unión (Nariño) en noviembre del mismo año.

Este material se compuso de lo siguiente:

a) Un mono (*Macacus rhesus*), inoculado en el lugar de la epidemia con triturado de verruga humana; dos monos con medula esternal de dos enfermos verrucosos.

b) Varias muestras de sangre y suero de enfermos febricitantes con verruga, y abundantes bartonellas en los glóbulos rojos.

c) Posteriormente el doctor Raúl Jaramillo envió dos muestras de sangre citratadas con abundantes bartonellas intracelulares.

De este material, a excepción de los dos monos inoculados en Nariño con medula esternal, se aislaron en cultivo puro varias ce-

(1) Trabajo presentado al VIII Congreso Científico Panamericano, Washington. D. G. 1940.

Estos estudios se hicieron en la Sección de Epidemiología del Instituto Nacional de Higiene Samper-Martínez.

(2) La Comisión fué integrada por el Profesor Emile Brumpt y los doctores Juan Antonio Montoya, Ernesto Osorno, Hernando Uerós, Benjamín Otálora y Lucien Brumpt.

pas de un microorganismo que, como se verá más adelante, se identificaron como bacteriológicamente iguales a la *Bartonella bacilliformis* (Strong et al. 1915). A continuación se describen las experiencias hechas con este germen. Los datos que se han tomado de trabajos de otros autores llevan anotada la referencia correspondiente.

I. OBSERVACIONES BACTERIOLÓGICAS

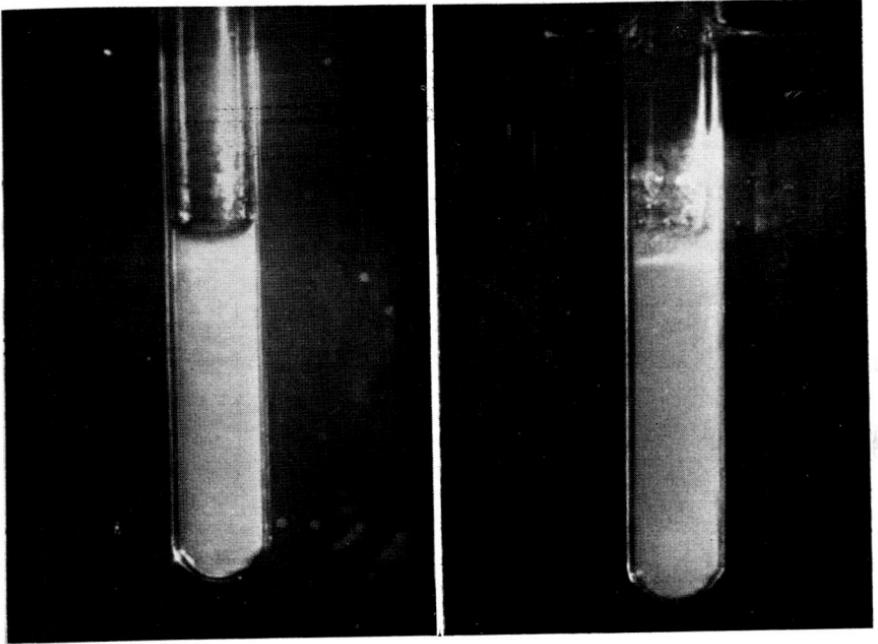
a) Morfología:

Se trata de un germen muy polimorfo tanto en la sangre como en los cultivos. En los glóbulos rojos se presenta unas veces en forma de bacilos, en ocasiones granuloso, uniforme o irregularmente teñidos; hay formas bipolares, cocoideas de diversos tamaños, con bordes más o menos regulares. Entre las formas bacilares y las cocoideas existen todas las intermediarias: formas en diplobacilo, en diplococo, en V, y Y, formas bacilares alargadas y granuloso como en rosario, etc. Este mismo polimorfismo existe en su modo de agrupamiento: se encuentran cadenas bacilares más o menos curvas desde 2 elementos hasta 8 o más; las formas cocoideas unas veces están aisladas, y otras en grupos de dos o más elementos; también se encuentran grupos de gérmenes en paquetes, en forma de letras chinas, etc., semejantes a las agrupaciones adoptadas por el *Corynebacterium diphtheriae* en medio de Loeffler.

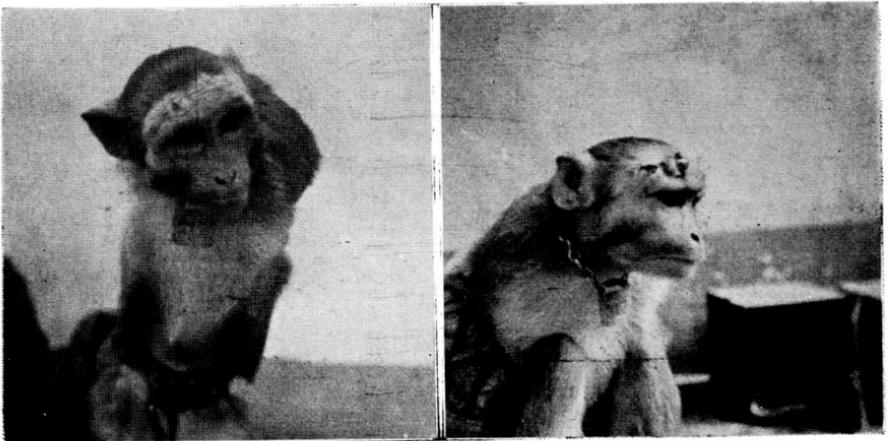
Durante estas experiencias se encontraron en una lámina de sangre, extraordinariamente rica en bartonella, algunas fuera de las células, y en dos ocasiones, en la sangre de un mono muy anémico inoculado con verruga de origen simio. Queda la duda de si esta posición fué debida a desgarradura de los glóbulos rojos en el frote o si realmente las bartonellas fueran primitivamente extracelulares. En un mismo glóbulo rojo pueden presentarse varias bartonellas, especialmente en las infecciones intensas, en las que se pueden encontrar eritrocitos con 12 o más gérmenes.

En los cultivos en medio semi-sólido de Noguchi para leptospira se encuentran formas bacilares de 0.3 a 3 micras de largo por 0.2 a 0.5 de ancho y cocoideas de 0.7 a 1.2 según Noguchi y Battistini, que difieren de las descritas anteriormente en que no forman cadenas de más de 3 elementos, en que las formas granuloso son mas escasas y cortas y en que con mucha frecuencia se ven masas de gérmenes muy numerosos, hasta de varios centenares.

La morfología cambia poco con la edad del cultivo (desde 4 hasta 56 días), y con la temperatura a que se haya mantenido (25°, 28° y 37° C); quizá son más frecuentes las formas cocoideas en los cultivos que son positivos al examen microscópico, pero no a la



Cultivos de **Bartonella bacilliformis** en medio semisólido de Noguchi para leptospira.



Mono 317. Lesiones a los 15 días de inoculado con triturado de verruga humana.

Mono 317. Lesiones a los 24 días de inoculado.

simple vista, y en los demasiado antiguos. Lo mismo se puede decir de los cultivos en gelosa sangre-hormona, en medio semi-sólido con gelatina, y en medio de Loeffler, aun cuando en los pases en gelosa sangre-hormona muy reciente (de 3 a 4 días) predominan claramente las formas cocoideas. En caldo glucosado sembrado con sangre se han encontrado formas cocoideas en los restos globulares, pocas veces extracelulares y casi nunca formas bacilares. Al campo oscuro se observan las mismas masas de pocos o muchos elementos y en los aislados se encuentran formas bipolares muy netas, formas bacilares con o sin gránulos de mayor o menor longitud y formas cocoideas.

b) Motilidad:

Al fondo oscuro las formas bacilares son bastante móviles, atraviesan el campo microscópico con rapidez; las masas pequeñas y las formas bipolares tienen movimientos más lentos. Mirando detenidamente y sin alterar el foco visual, se observan a veces gérmenes bipolares móviles que se ven desaparecer momentáneamente para reaparecer en seguida, lo que se debe posiblemente a movimientos activos en el sentido vertical; igualmente se pueden apreciar movimientos de progresión lenta sobre el eje longitudinal del germen. En los cultivos en medio semi-sólido de Noguchi, los gérmenes son muy poco móviles; en los de gelosa sangre-hormona y en los de medio semi-sólido con gelatina son más activos. En campo claro con objetivo seco de gran aumento y con diafragma convenientemente regulado se puede observar la motilidad aunque con caracteres menos definidos.

Todos los fenómenos de motilidad se observan con mayores detalles en los cultivos obtenidos en medio semi-sólido con gelatina, dadas la mayor transparencia de la preparación, la fluidez del medio y el hecho de que entre lámina y laminilla la gelatina se solidifica más lenta y uniformemente que la gelosa.

c) Coloración:

1. Giemsa: (Técnica de la "Experimental Station for Malaria Research" de Tallahassee). Los microorganismos se coloran en violeta rojizo semejante a la coloración de los núcleos de los leucocitos, tanto en la sangre como en los cultivos. La coloración de todos los elementos no es uniforme; hay algunos que quedan casi rosados. Las formas cocoideas y las granuladas se tiñen más intensamente.

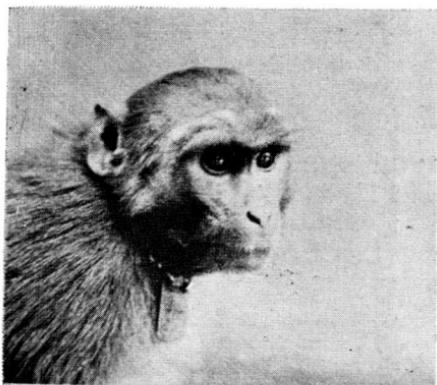
2. Leishmann: (Técnica usual). Toman la coloración de los núcleos de las células sanguíneas con las mismas variaciones de la co-



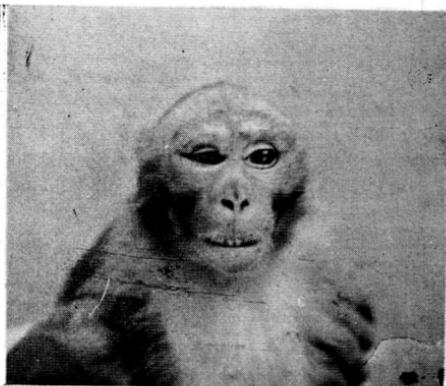
Mono 317. 27 días después de inoculado. Nótese costras hemorrágicas.



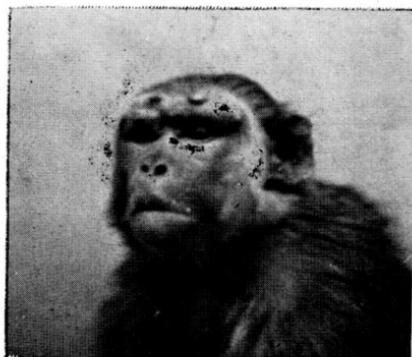
Mono 317. Obsérvese edema a los 29 días de la inoculación.



Mono 317. Curación espontánea y total a los 53 días de inoculado.



Mono 319. Lesiones a los 9 días de inoculado con triturado de biopsia de verruga del mono N° 317.



Mono 319. 15 días después de la inoculación.



Mono 319. 22 días después de inoculado. Nótese edema considerable.

loración anterior. En los frotos de cultivos esta coloración presenta algunos inconvenientes.

3. May-Grünwald-Giemsa: Las coloraciones quedan muy hermosas y las bartonellas toman la coloración nuclear.

4. Gram: Son en general Gram negativas, pero también varía la intensidad de la coloración de unos elementos a otros.

5. Zettnow: Con esta coloración Noguchi observó que la *Bartonella bacilliformis* tiene 2 o más flagelos unipolares de 2 a 5 micras de longitud. Algunos flagelos desprendidos pueden alcanzar hasta 20 y 30 micras.

6. Coloraciones varias. No son ácido-resistentes. Se ensayaron algunos otros métodos de coloración: Stoltemberg, Azul de Loeffler, etc., que no se comentan porque resultan inferiores a las descritas anteriormente.

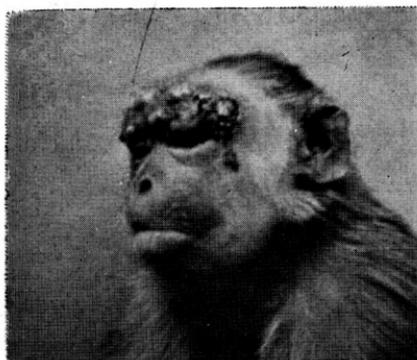
d) Cultivos:

Es un germen aerobio, no estricto (ha prendido en tubos cerrados a la lámpara, con capa de aceite y hasta 3.5 centímetros de profundidad en medio semi-sólido de Noguchi para leptospira); se desarrolla con dificultad en ocasiones en los cultivos y exige medios ricos. Hasta ahora se ha obtenido su cultivo en medio con suero humano o de otras especies de animales, con sangre total o tejidos vivos. Algunos autores (Bol. de la U. Pan. Septiembre 1939) dicen haberlo logrado también en caldo glucosado. El pH óptimo es 7.8, pero admite una escala relativamente amplia, de 7.0 a 8.4. Según Noguchi y Battistini el pH óptimo es 7.8 pero admite variaciones entre 6.8 y 8.4. El pH de los lotes de medio de cultivo que se han usado aquí ha oscilado entre 6.8 y 8.3; y se notó que el cultivo en un lote de pH 8.3 era más lento y más pobre que el de los otros.

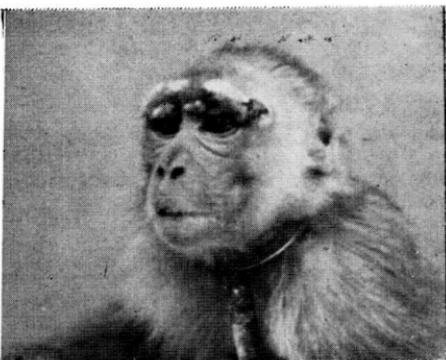
Los cultivos primitivos se demoran varios días o semanas en hacerse visibles. En estas experiencias ha variado este lapso entre 2 y 26 días en las siembras provenientes de seres humanos o de monos; en los subcultivos se hace quizá más corta la aparición de colonias, en general del 5º al 7º día, factor que varía según el medio empleado.

En medio semi-sólido con gelatina (subcultivos) se ha observado la aparición de colonias abundantes entre las 24 y 48 horas a 28º C. Asimismo se ha obtenido el desarrollo de la bartonella por hemocultivo partiendo de exudado sanguíneo post-biopsia de verruga de mono, a los 2 días.

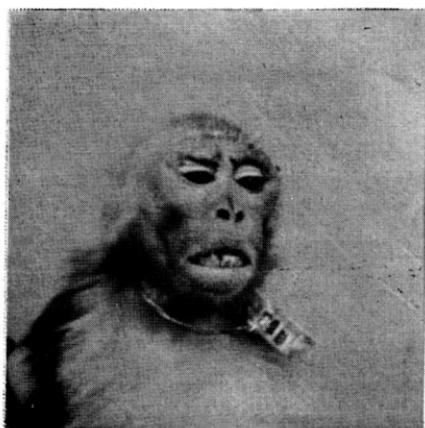
En general los cultivos son inconstantes y muy irregulares; se han presentado varios casos en que de 4 tubos de medio de Noguchi del mismo lote y sembrados del mismo modo, con una sangre positiva de bartonella al examen microscópico, se desarrolle ésta en uno



Mono 319. 24 días después de la inoculación. Se inicia la mejoría.



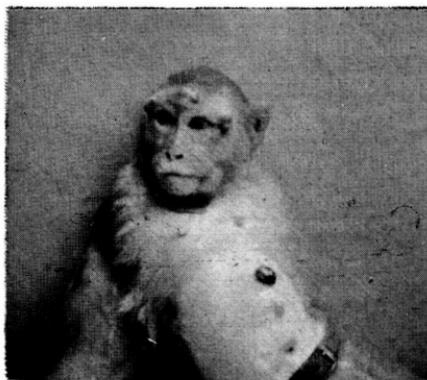
Mono 319. Regresión apreciable a los 34 días de inoculado.



Mono 319. Curación casi completa, 40 días después de la inoculación.



Mono 329. Verrugas "mulars" en la pared abdominal.



Mono 318. Verrugas supraciliares y verruga "mular" de gran tamaño en la pared abdominal.



Perro N° 1. Iniciación de la verruga.

solo; otras veces crece en otros medios de cultivo y el de Noguchi permanece negativo o viceversa. En ocasiones, varios tubos de medios de los mismos lotes sembrados en igualdad de circunstancias, con una misma sangre, muestran la aparición de colonias en días distintos, desde el 5º hasta el 9º. El aspecto de los cultivos cambia según el medio empleado y la edad de las colonias.

La *Bartonella bacilliformis* es muy resistente y permanece viva, según Noguchi, en la sangre infectada mantenida en refrigeradora por mucho tiempo. Este autor obtuvo cultivos después de 152 días de permanencia a 4º C; y después de 67 días a la temperatura ambiente. En los cultivos en medio para leptospira obtuvo a 25º C. después de 120 días y en la refrigeradora después de 4 meses de permanencia.

Nuestras experiencias a este respecto han mostrado lo siguiente: Cultivos de sangre positiva después de 48 días (4 mantenidos a la temperatura ambiente durante el viaje de La Unión a Bogotá, y el resto del tiempo a 6º C) y subcultivos en medio de Noguchi mantenidos a la temperatura ambiente al cabo de 163 días. En la sangre mencionada se veían aún al final de este término bartonellas muy claras en los glóbulos rojos. Estos datos son de mucha importancia para las campañas epidemiológicas que se emprendan.

1. Medio semi-sólido de Noguchi para leptospira: En la mayoría de las observaciones el desarrollo se efectúa del 5º al 7º día, en forma de una nubecilla blanquecina a unos 5 ó 6 milímetros de la superficie; se distingue mejor a la luz refleja. Esta nubecilla crece en los tubos en ambos sentidos hasta que forma un anillo más o menos ancho (3 a 8 mm.). El anillo desde que ha alcanzado su máximo desarrollo permanece estacionario por muchos días, hasta la muerte de los gérmenes. El número de días en que se nota crecimiento ha sido muy variable, en términos generales entre 20 y 40 días a 28º C. A 37º C. crece más rápidamente y se detiene más pronto, a los 15 días o menos.

Otras veces el cultivo se presenta en forma de colonias aisladas a lo largo del inoculum. Estas colonias son de color blanquecino y algunas forman un halo tenue a su alrededor. Algunas veces estas colonias se hacen confluentes y dan lugar a la formación de una nubecilla en anillo, análoga a la descrita anteriormente. Se han encontrado desde la superficie hasta una profundidad de 3.5 cm. En este medio se encuentran gérmenes al microscopio uno o dos días antes de que el cultivo se considere positivo a la simple vista con luz directa y a la transiluminación.

Al microscopio (230 diámetros) las colonias son redondas de 1 mm. más o menos de diámetro, de centro abultado, de bordes regulares e irregulares y algunos con mamelones en la superficie; el

color es blanco amarillento casi siempre. Los anillos muestran una serie de grumos más pequeños.

El primer cultivo partiendo de sangre humana se obtuvo el día 17 de octubre de 1939.

2. Medio semi-sólido con gelatina: Deseosos de obtener cultivos en medios apropiados de una densidad menor a la del medio original de Noguchi, se intentó una modificación de éste, consistente en reemplazar la gelosa con gelatina (1), (hasta ahora hemos usado gelatina "Dyfcó"), considerando por una parte los caracteres nutritivos de ésta al mismo tiempo que el hecho de mantenerse flúida a 28° C. Es de la mayor conveniencia que el medio sea absolutamente transparente, para lo cual conviene filtrar la solución de hemoglobina lo que evita la presencia de grumos fibrinosos y restos de glóbulos rojos que opacifican el medio y falsean la apreciación de las colonias. Se ha repartido el medio en tubos de prueba y en pequeñas fioles de cuello largo (frascos de Stoll), llenándolos hasta la base del cuello.

En subcultivos, partiendo del medio original de Noguchi, al lado de un precipitado amorfo constituido por restos de gelosa y al cabo de 1 ó 2 días se observa en el fondo la aparición de colonias minúsculas; al hacer girar el tubo o la fiola sobre su eje vertical, el precipitado y las colonias se difunden en espiral por todo el medio. En las resiembras sucesivas se elimina poco a poco la gelosa y se observa el desarrollo de las colonias aisladas con gran nitidez y precisión. Con el tiempo las colonias crecen y se agrupan en grumos irregulares semejantes a miga de pan; para observar estos fenómenos es indispensable dar al recipiente el movimiento giratorio de que se habló para así apreciar la diseminación de las colonias que permanecen estacionarias en el fondo. De nuevo en reposo las colonias vuelven poco a poco a su posición primitiva. Dada la gran exuberancia de los cultivos en este medio, comparado en condiciones idénticas con el original de Noguchi, ofrece la enorme ventaja de facilitar la obtención de cultivos en masa.

3. Gelosa sangre-hormona (Huntoon) al 20 %: Las colonias aparecen casi siempre del 4º al 6º día. Los hemocultivos son muy inconstantes; en general son más seguros en el medio de Noguchi. Los subcultivos son más constantes y de crecimiento más rápido; hubo un caso de aparición al 2º día pero lo común es al 4º. Al principio las colonias son del tamaño de la cabeza de un alfiler y luego

(1) Fórmula: Solución salina (8,5 o/100)	80 cc.
Suero de conejo o humano (inactivado)	10 cc.
Gelatina nutritiva al 10 %	10 cc.
Hemoglobina de conejo	2 cc.

crecen hasta tener un diámetro de 1,5 mm. más o menos; rarisimas veces se hacen confluentes; presentan un aspecto de pequeñas manchas de parafina y son adherentes al medio; son compactas y por lo general se desprenden completas al raspado con el asa. El tipo predominante es el de la colonia "rough" muy pocas son del tipo "smooth". También llega un momento, que es bastante variable, en que permanecen estacionarias hasta que mueren comúnmente por desecación del medio. Al microscopio presentan un aspecto muy semejante al descrito en las del medio de Noguchi.

4. Otros medios: En medio de Loeffler, el cultivo es muy precario e inconstante, las colonias son muy pequeñas, apenas visibles a simple vista, con una fuerte luz refleja; no modifican el medio y mueren rápidamente.

En caldo glucosado los cultivos no han prendido sino en las siembras directas de sangre y en muy pocos tubos. El cultivo se presenta en forma de hilos muy tenues que se localizan inmediatamente por encima del sedimento globular. Algunos tubos tienen un aspecto finamente granuloso en el fondo que se observa al sacudirlos.

Al microscopio casi nunca se ven formas bacilares y la mayor parte de las cocoideas se encuentran en los restos globulares al colorear los frotos.

En caldo infusión glucosado de un pH de 7 a 7.4 sin ningún otro elemento, no ha prendido las resiembra provenientes de otros medios.

Se han ensayado otros medios con la mira de obtener cultivos más ricos y más fácilmente purificables; pero no se ha conseguido tal objeto. Se obtuvieron cultivos pobres y muy irregulares en solución Tyrode con suero y sangre humana y de conejo y en medio de Stefanopoulo. Tampoco se ha logrado tener cultivos, a pesar de haberlo intentado gran número de veces en gelosa infusión, gelosa extracto, gelosa sangre ordinaria, medio de Ungerman, caldos ordinarios, con hidratos de carbono y con extracto globular.

5. Según Noguchi y Battistini la bartonella no fermenta ninguno de los siguientes hidratos de carbono: dextrosa, sacarosa, galactosa, maltosa, levulosa, xilosa, lactosa, mannososa, manita, dulcita, arabinosa, rafinosa, rhamnosa, dextrina, inulina, salicina y amigdalina. No hemos experimentado hasta ahora sobre este punto.

En el Instituto se conservan ejemplares de cada una de las cepas humanas y de las cepas de cada uno de los monos.

Para evitar la resiembra periódica se ensayó con buen éxito la congelación y desecación de cultivos y sangres al vacío según la técnica de Harris y Shackel, adaptada por Sawyer y Lloyd para desecación del virus de fiebre amarilla.

II. INOCULACIONES EXPERIMENTALES

a) *Macacus rhesus*: Estas observaciones se basan en doce monos inoculados hasta hoy de la siguiente manera:

Triturado de verruga humana	1
Material de medula esternal de 2 enfermas	2
Triturado de verruga de mono.	3
Triturado de verruga de perro	1
Cultivos medio Noguchi de sangre humana	1
“ “ “ de sangre humana y de mono	1
“ “ “ sangre de mono.	1
“ “ “ de mono y de perro.	1
“ “ “ (cepa peruana) (1)	1

El único material no infectante fué la medula esternal de las dos enfermas verrucosas del hospital de la Unión (Nariño) inoculadas allí mismo.

Cada animal reaccionó de modo diferente a los demás, pero sin embargo todos presentaron algunos síntomas comunes entre sí, aun cuando con distintos matices de intensidad y duración en la evolución, que justifican un resumen de las lesiones para mayor brevedad y claridad.

Es bueno hacer notar que todos estos monos habían sido inoculados tiempo atrás con virus de fiebre amarilla.

En ellos se han logrado reproducir los principales síntomas de la enfermedad de Carrión: curva febril irregular, anemia intensa, septicemia de *bartonella* y verruga de los tres tipos clínicos descritos por Escomel.

1. Fiebre. La temperatura rectal normal de estos animales oscila considerablemente a juzgar por las variaciones encontradas en las observaciones hechas aquí en monos aparentemente sanos; en éstos se hallaron oscilaciones entre 37.3° C. y 39.5° C. en términos generales.

Para no incurrir en errores se ha dejado un gran margen y sólo se ha considerado el animal como febricitante cuando su temperatura pasó de 39.5. La fiebre en los animales que la han manifestado ha sido siempre muy irregular, carácter asignado a la de la septicemia de *Bartonella bacilliformis*. Su duración ha sido también muy variada. Durante la evolución se presentaron períodos apiréticos sin ninguna regularidad. Tampoco se encontró curva de tipo

(1) Esta cepa fué amablemente remitida al Instituto por el doctor David Weinman de la Universidad de Harvard.

más o menos constante entre las temperaturas de la mañana y las de la tarde. Estas se tomaron a las 9 a. m. y a las 4 p. m.

2. Anemia. Juzgar la anemia y sobre todo su intensidad por el número de glóbulos rojos es también muy difícil por falta de hemograma normal en nuestras condiciones. Estimando "grosso modo" como número normal de eritrocitos 7 millones por milímetro cúbico, se puede decir que hubo anemia en varios de ellos. En dos fué muy intensa pues el número de glóbulos rojos se redujo a 3 millones o un poco menos. Los exámenes hematológicos fueron hechos cada dos días en un período, y después dos y una vez por semana. La sangría se hizo estando los animales en ayunas, de la vena safena, y en unos pocos casos, de la oreja. Las cuentas globulares se hicieron siempre con los mismos elementos y de igual manera. Con las mismas salvedades se puede hablar de que se presentó hiperleucocitosis en algunos casos. (En varias ocasiones se contaron 17.000 glóbulos blancos y en un mono llegaron a 28.000 por milímetro cúbico).

En los dos monos en que la anemia fué más intensa, los animales se pusieron subictéricos y en esos días presentaron frecuentes calofríos especialmente por la mañana y por la tarde al caer la temperatura ambiente.

3. Septicemia. Al contrario, de lo que ocurre en los casos humanos donde la bartonella invade en ocasiones casi el ciento por ciento de los hematíes, en los monos es poco intensa y en nuestros animales sólo se ha podido descubrir por el hemocultivo. Los frottes de sangre, de los cuales se hicieron unos 150 en días diferentes y en todos los períodos de la enfermedad, fueron siempre negativos, excepto en dos hechos con dos días de intervalo del mono N^o 321, cuando su anemia era muy intensa (3.240.000 y 2.730.000 por milímetro cúbico respectivamente), en los que se observaron varios grupos de organismos extracelulares, que quizá se pudieran considerar como del germen de que tratamos, a pesar de su posesión fuera de los glóbulos rojos y de que se coloraron con el método de Giemsa de una manera un poco diferente porque tomaron un color azulado en vez de violeta rojizo usual. Es bueno anotar que con esta misma sangre se obtuvo un cultivo positivo en varios medios, sin ningún contaminante. Noguchi encontró en unos pocos de sus monos bartonellas intraglobulares muy escasas y preconizó el hemocultivo como medio más seguro para descubrir la infección.

En nuestras experiencias encontramos el germen por hemocultivo en los casos más precoces a los 7 días de la inoculación, en algunos animales después de franca mejoría de las lesiones externas y en otro después de su curación aparente.

Creemos que el método más recomendable para hacer los he-

mocultivos (el que mejor resultado nos ha dado en unos 50 que hemos hecho) con las mayores probabilidades de buen éxito y sin salirse mucho de las condiciones prácticas, es el de usar para las siembras 3 tubos de medio semi-sólido de Noguchi, por lo menos 2 de gelosa sangre-hormona inclinada, 1 de caldo glucosado y 1 de gelosa ordinaria y de caldo ordinario para descubrir las posibles contaminaciones extrañas más rápidamente.

4. Verruga. Sin excepción, todos los monos inoculados han desarrollado verrugas independientemente del material usado que ha sido diverso en cuanto a cantidad, origen, naturaleza y vía de introducción. (Verrugas humana, de mono y de perro, cultivos en medio de Noguchi de procedencias humana, de mono y de perro, de re-siembras diferentes y de períodos de incubación variables a 18 grados. Las inoculaciones se han hecho por vía intracutánea, intraperitoneal e intravenosa. Los caracteres y la evolución han variado con cada animal.

La fecha de aparición que parece independiente de la vía empleada, ha sido de unos 4 días en los más precoces (321 y 329) y de 17 días en el más retardado (337); en los demás, ha sido de 5 días en uno (324), de 7 en uno, de 8 en 3, de 9 en 1, de 12 en 1 y de 15 en 1. Estas fechas se determinaron tomando como base la aparición de nódulos perfectamente notorios en los puntos de inoculación. En todos hubo un período intermedio en el que desaparecieron claramente las huellas del traumatismo causado por las inoculaciones.

El desarrollo máximo de las verrugas varió entre 18 y 35 días después de la fecha en que se hicieron notorias, y entre 18 y 42 días después de la inoculación. Las mulares se demoraron más en alcanzar su máximo desarrollo que las otras, y las nodulares en general más que las miliares. Este desarrollo se hizo gradualmente; después de que avanzan un poco se forma un edema blando y blanco que conserva la impresión del dedo por un rato, en los tejidos que los rodean. Ha sido más extenso y grande en las verrugas ciliares que en las abdominales; en aquéllas hay veces que se ha edematizado toda la cara y parte del cuello, siendo en algunos casos tan grande el edema de los párpados que el animal no podía abrir los ojos, y en estos casos presentaron conjuntivitis en el período más agudo.

En este período y en el de estado las verrugas sangran muy fácilmente, el menor roce produce hemorragia que se detiene cuando se forma una costra para volver cuando ésta se cae. Esto se observó especialmente en las verrugas mulares. Se infectan secundariamente con extrema facilidad y prontitud; casi nunca supuran por sí mismas y cuando lo hacen dejan salir un pus grumoso en el cual no hemos logrado encontrar microorganismos ni al microscopio ni al cultivo.

Después de unos pocos días en que las verrugas permanecieron estacionadas comenzaron su período de regresión espontánea que se terminó en el de curación más rápida a los 56 días, y en el de más retardada aún perduran pápulas rojizas y escamosas en los sitios inoculados después de 4 meses del comienzo de las lesiones. La fecha de curación va en orden decreciente de las mulares a las miliares. La curación ha sido total. La verruga se va reabsorbiendo lentamente hasta dejar una pápula dura, rojiza y escamosa; esta desaparece en unos días quedando una mácula violácea que se acaba completamente al cabo de una o dos semanas. La curación es tan cabal, que vuelve a nacer pelo en el sitio de las lesiones y que, después de un tiempo, es imposible hallar los puntos en que estaban localizadas.

Hubo verrugas mulares en 3 monos, miliares en 3 y nodulares en todos. En el macaco no se ha logrado aún la generalización. En este grupo siempre aparecieron localizadas en los sitios de inoculación, excepto en tres monos en que se formaron espontáneamente en puntos vecinos a la inyección. Estas verrugas no alcanzaron a pasar de miliares.

Es digno mencionar que en dos animales se desarrollaron verrugas típicas en los puntos de la safena utilizados para las sangrías y en los cuales hubo extravasaciones sanguíneas; en otro, en el sitio de la safena en el que se inoculó material infeccioso, se anotó también la presencia de una verruga debida a extravasación del material inoculado.

En la mayoría de los animales se produjeron excoriaciones y ulceraciones en el abdomen y el cuello por el uso de collares y en otras partes del cuerpo por traumatismos accidentales en las jaulas. Algunas de estas se infectaron pero en ninguna hubo manifestación de lesiones de bartonella a pesar de que estuvieron en contacto con sangre infectante de las verrugas y con material infeccioso, (roce collares, etc.).

Otro de los síntomas que presentaron los animales, sin excepción, fué la hipertrofia de los ganglios axilares e inguinales; esta última en los inoculados en el abdomen y en las piernas. Los ganglios colectores en las regiones faciales en que hubo lesiones no se hipertrofiaron lo bastante para hacerse sensibles al examen externo, que se hizo cuidadosamente y repetidas veces durante la evolución. No se presentó la poliadenitis generalizada mencionada por Noguchi en sus animales.

Entre otros síntomas mencionables están el de que los animales se mostraban muy decaídos, quietos, con el pelo erizado, la piel violácea, anorexia e indiferencia cuando la temperatura subía al rededor de 40° C. y cuando la anemia se hacía muy intensa. En los períodos avanzados de anemia también presentaban frecuentes

calofríos especialmente al caer la temperatura ambiente por la mañana y por la tarde.

La enfermedad no se ha propagado en la colonia simia por contacto íntimo entre animales infectados y animales sanos (algunos de éstos con ulceraciones cutáneas accidentales), ni por el intercambio de sus parásitos que es muy intenso debido a las costumbres de esta especie.

b) Perros. Se ha experimentado con 10 perros, todos de los llamados "criollos" o "gozques" de 2 a 3 meses de edad y un peso entre 1.200 y 2.200 gramos y 1 de 6 meses cuyo peso pasaba de 8.000 gramos.

El material infectante inoculado se compuso de triturados de verruga de mono y de perro; de cultivos provenientes de perro y de verruga de monos; de cultivos de origen humano y uno de origen peruano. Los dos últimos no prendieron probablemente por pérdida de virulencia en la estadía en medios de cultivo y mayor resistencia de los animales; en los dos monos de control, las lesiones fueron más retardadas y benignas.

Parece que no hubiera diferencia muy marcada en la virulencia de los materiales infectantes: todos presentaron más o menos la misma sintomatología, a excepción de los dos casos refractarios ya mencionados.

Cada uno de los perros evolucionó diferentemente. La infección en ellos es mucho más grave que en los macacos; hubo un 50% de mortalidad atribuible a la enfermedad.

La mayoría presentaron o esbozaron los grandes caracteres de la enfermedad de Carrión en el hombre y en los monos.

1. Fiebre. Es muy difícil apreciarla sobre todo cuando no es muy alta por las mismas causas que en el mono. Para tener un gran margen de seguridad no se habla aquí de fiebre sino cuando la temperatura pasa por encima de 39.5° C. y de hipotermia cuando baja de 36.5° C. Basándonos en estas cifras sólo puede decirse que la fiebre fué muy irregular en todo sentido. Durante la evolución se presentaron períodos apiréticos sin regularidad alguna. La temperatura subía unas veces más por la mañana que por la tarde, o viceversa, predominando el alza vespéral en general, pero también con grandes diferencias de un caso a otro y de unos días a otros. Hubo alzas de temperatura en todos los períodos de la enfermedad; fueron un poco más constantes en los de desarrollo y de estado. Los animales que tuvieron diarrea presentaron hipotermia, gran emaciación antes de la muerte. No se encontraron en estos animales parásitos intestinales ni huevos en las materias fecales.

2. Anemia. No conocemos el hemograma normal de nuestros perros y así es difícil apreciar límites precisos en que se puedan

determinar ligeras bajas en las cuentas de glóbulos rojos. Sin embargo, se presentaron policromatofilia, anisocitosis, y normoblastos. Fué intensa la anemia en algunos de ellos, sin alcanzar los límites de la humana o de la simia. En unos pocos se presentó una hiperleucocitosis marcada. En los períodos anémicos más intensos el animal sufría frecuentes calofríos, el pelo se le erizaba y estaba muy decaído, sin poder casi caminar.

3. Septicemia. No se encontraron bartonellas al microscopio ni dentro ni fuera de los hematíes, a pesar de que se examinaron varias preparaciones de sangre muy detenidamente, (al rededor de 2.000 glóbulos en cada frote), y unos 100 frotos hechos en todos los períodos de la enfermedad. Se recuperó la bartonella en dos casos por hemocultivo. En los otros no se intentó por dificultades de diverso orden para hacer siembras de sangre repetidas. La bartonella aislada en los hemocultivos es bacilliformis por sus caracteres bacteriológicos y biológicos y porque reprodujo la enfermedad en monos; si hubiera sido *Bartonella canis* habría sido inocua para éstos.

4. Verrugas. Fueron todas del tipo miliar y nodular. Ninguna alcanzó a alterar la piel y permanecieron subcutáneas durante toda su evolución. Tampoco hubo hemorragias ni espontáneas ni traumáticas. En las necropsias se encontraron siempre subcutáneas y envueltas en una cápsula relativamente resistente, rodeadas de una zona congestiva y en unos pocos casos con hemorragias punctiformes.

Fueron más grandes y extensas de lo que parecían a la palpación externa y las verrugas frontales (cuando hubo 3 o más en una área de 5 centímetros más o menos) se hicieron casi confluentes.

En dos perros hubo aparición de verrugas espontáneas a mayor distancia que en los monos; en el número 692 se presentó una en la pierna izquierda; en el 649, dos en el abdomen a 3 o 4 centímetros de los puntos de las inoculaciones; estas verrugas fueron tan típicas como las otras.

Su estudio anatomo-patológico no se ha hecho aún, pero su naturaleza queda demostrada por el hallazgo de la bartonella intracelular en algunos frotos por oposición y por haberse demostrado que reproducían la enfermedad tanto en el perro como en el mono.

Período de incubación. El más corto fué de 6 días y el más largo de 31. En la mayoría osciló entre 8 y 11 días.

Período de desarrollo. Fué de 17 días el más precoz y de 22 el más retardado. Se hizo lenta y gradualmente, como en los monos. Alrededor de las verrugas en algunos perros se presentó un ede-

ma análogo al de los monos, aunque no tan extenso; fué más marcado en las verrugas abdominales.

Período de estado. Duró sólo unos pocos días.

Período de regresión. Se hizo en un lapso de 35 días más o menos. Las verrugas evolucionaron de manera gradual y la curación fué completa sin dejar huellas.

No se presentó en ninguno hipertrofia ganglionar generalizada. Sólo en el número 640 se halló a la necropsia un ganglio torácico hipertrofiado. El estado general se alteró notablemente durante el período avanzado del desarrollo de las verrugas.

En los casos graves el animal se mostraba muy abatido y débil, adinámico, indiferente y sin apetito, con el pelo erizado y frecuentes calofríos. Este estado duraba de uno a cuatro días y terminaba por la muerte, en la mayoría de los casos; en los que hubo mejoría, este período fué más corto y los síntomas menos agudos. En 3 perros hubo diarrea profusa en los días que precedieron a la muerte; en los números 2 y 8 fué de 8 días más o menos y con caracteres parecidos a los de la psilosis; en el número 649 fué de 2 días apenas. La muerte se presentó a los 19, 31 y 57 días de la inoculación en los casos fatales.

Hallazgos macroscópicos en las necropsias: El corazón se encontró dilatado, el bazo hipertrófico y de consistencia normal en dos; y en uno la vejiga muy congestionada.

c) Monos criollos (*Cebus apella*). De esta especie apenas se ha inyectado un solo ejemplar hasta ahora.

Se inoculó con triturado de verruga del mono 322 por vía intradérmica en dos sitios de la región de las cejas y en tres sitios de la región abdominal, con 0.125 centímetros cúbicos cada punto con emulsión de tejido en solución salina al 10% más o menos, y con un centímetro cúbico de ésta por vía intravenosa. La inoculación se hizo el 3 de febrero de 1940, y el día 8 comenzaron a esbozarse pequeños nódulos rojizos en los puntos abdominales. Un día después se hizo un hemocultivo que fue positivo a los 13 días; los frotos de sangre hechos al mismo tiempo fueron negativos. Al 9º día apareció un nódulo pequeño en uno de los puntos ciliares. Al 12º día se hizo otro hemocultivo que resultó negativo (se observó durante 26 días) lo mismo que los frotos. Los nódulos siguieron aumentando muy lentamente su tamaño hasta el 12º día, en que murió por un traumatismo accidental.

En la necropsia se encontró que los nódulos eran muy parecidos macroscópicamente a los de los *Macacuss rhesus*. El estudio anatomo-patológico aún no se ha hecho. Con uno de los nódulos se obtuvo un cultivo de *Bartonella bacilliformis*.

d) Curies. Se buscó la receptividad en animales adultos y esplectomizados y en animales muy jóvenes. Se inocularon con tri-

turado de verruga infectante de mono, 0.25 c.c. por vía intradérmica y 1 c.c. por vía intraperitoneal (los controles en *Macaccus rhesus* fueron positivos); se usaron dos curies de un mes de edad y dos adultos, esplenectomizados previamente, y en los cuales no se había encontrado la *Bartonella tyzzeri* (Weinman y Pinkerton) por exámenes repetidos hechos durante los 30 días que transcurrieron desde la operación hasta la inoculación con triturado de verruga. También se inocularon otros dos curies adultos esplenectomizados con triturado de otra verruga infectante y con cultivos virulentos de origen simio, usando como control un macaco que desarrolló la enfermedad característica; en estos últimos curies se excluyó por exámenes repetidos la afección por *Bartonella tyzzeri*. Estos animales se observaron diariamente; se les practicaron dos a tres exámenes hematológicos semanales durante dos meses, sin encontrar nunca bartonellas ni lesión alguna sospechosa de la enfermedad de Carrión. En uno de los normales jóvenes se presentaron nódulos pequeños localizados en los sitios de las punciones y formas anémicas de los hematíes (policromatofilia, glóbulos granulosos y normoblastos) que desaparecieron en pocos días sin dejar huellas. Unos pocos hemocultivos que se hicieron fueron negativos e infortunadamente se contaminaron muy pronto.

En resumen, estos animales fueron refractarios a la infección experimental con *Bartonella bacilliformis*. Por lo demás, esto concuerda con las experiencias hechas por otros autores.

Se esplenectomizaron 14 curies entre los comunes y los llamados "pastusos", variedad muy abundante en el Departamento de Nariño; en ninguno de ellos se encontró infección espontánea por bartonella en un período de observación que varió de 1 a 3 meses.

e) Ratas blancas. Se inocularon 2 ratas blancas esplenectomizadas un mes antes y después de varios exámenes hematológicos negativos para *Bartonella muris*. El material infectante usado (comprobado por controles positivos) fué triturado de verruga de mono y se inyectó de 0.25 c.c. a 0.5 c.c. por vía intradérmica y de 0.5 a 1 c.c. por vía intraperitoneal. Se observaron por espacio de dos meses sin comprobar ninguna lesión sospechosa de *Bartonella bacilliformis*; los exámenes de sangre fueron también negativos.

Se esplenectomizaron dos grupos de 10 ratas blancas adultas, de las cuales murieron 16 a consecuencia de la anemia tan intensa que sufrieron por la aparición de una septicemia causada por la *Bartonella muris* (Katutk).

f) Ratones blancos (suizos). Experiencias similares se hicieron en 2 ratones blancos, de 21 días, el uno esplenectomizado y el otro no, con resultados negativos.

g) Chacures. (*Dayproctus variegata*). Inoculaciones similares

dieron resultados negativos. Este es un animal que se encuentra abundantemente en la región afectada por la epidemia.

h). Conejos. Se inocularon dos conejos de 1 mes y medio de edad, de manera similar a los curies y con idéntico material. Al cabo de 8 días se notó a la palpación nódulos muy pequeños en los sitios de la inoculación intradérmica del flanco, pero desaparecieron rápidamente. Todos los exámenes hematológicos hechos durante dos meses resultaron negativos.

III. ESTUDIOS INMUNOLOGICOS EN ANIMALES

En los macacos inoculados con nuestras diferentes cepas, la enfermedad ha producido inmunidad. Parece que ésta principiara poco después de la aparición de las verrugas y de la septicemia y que fuera duradera.

Queremos dejar sentado el hecho lisa y llanamente; el escaso número de observaciones que hemos podido hacer con respecto a esta faz del problema tan complicada e importante, no nos permite dar por ahora mayores detalles.

Los monos números 316 y 317 se mostraron inmunes a la reinoculación de triturado de verruga de mono, que, por otra parte, infectó normalmente al mono control.

Los macacos números 317 y 319 resistieron, sin ninguna manifestación morbosa, inoculaciones con cultivos virulentos (con contrales positivos) de origen simio y de perro. Estos mismos monos fueron también inmunes a la reinoculación con una resiembra infectante (con control positivo) en medio de Noguchi de la cepa de *Bartonella bacilliformis* de origen peruano, suministrada muy gentilmente al Instituto por el doctor David Weinman, de la Universidad de Harvard.

Por último los monos números 316, 317 y 318 no han manifestado signo alguno de infección, después de haber sido inoculados con triturado de verruga del mono número 325, el cual desarrolló verrugas típicas, después de haber sido inoculado con la cepa peruana.

Se han preparado algunos antígenos para efectuar reacciones de aglutinación y de precipitación; el escaso número de experiencias hechas hasta hoy no justifica aún su descripción. Partiendo de los cultivos en masa, obtenidos en medio semi-sólido con gelatina, se logran obtener emulsiones homogéneas de *Bartonella bacilliformis* en solución salina, que consideramos de interés para adelantar estudios inmunológicos.

Queremos expresar nuestros agradecimientos al Ministerio de Trabajo, Higiene y Previsión Social por las facilidades que nos pro-

porcionó para la iniciación de estos estudios; al doctor Horacio Parra-Escobar, quien se encargó de las esplenectomías y de varias necropsias; al doctor Hernando Rey-Matiz, quien se encargó en un tiempo de los exámenes hematológicos y de la observación de algunos animales, y a las señoritas técnicas del Instituto por su valiosa colaboración. Igualmente damos las gracias al doctor Hugh H. Smith, jefe de la Sección de Estudios Especiales, por habernos suministrado los *Macaccus rhesus* y chacures, y al doctor David Weinman por el envío de la cepa peruana de *Bartonella bacilliformis*.

CONCLUSIONES

I.—Del material procedente de enfermos de una epidemia en el Departamento de Nariño (Colombia) se aisló un microorganismo que se ha identificado como perteneciente a la especie *Bartonella bacilliformis* (Strong et al. 1915).

II.—Se describe una modificación del medio de Noguchi para leptospira que permite obtener un desarrollo rápido y cultivos en masa del microorganismo; partiendo de éstos se pueden obtener emulsiones homogéneas en solución salina de la *Bartonella bacilliformis*, que consideramos de interés para estudios inmunológicos posteriores.

III.—La *Bartonella bacilliformis* en la sangre de enfermos, y cultivada en medio de Huntoon, conserva su vitalidad sometida al procedimiento de congelación y desecación al vacío.

IV.—Las inoculaciones de *Bartonella bacilliformis* a los monos no inmunes *Macaccus rhesus* y *Cebus apella*, han dado pruebas de infección en un 100% de los casos.

V. El perro ordinario llamado "gozque" se ha mostrado bastante susceptible a la infección experimental en la mayoría de los casos; muchos desarrollaron verrugas y aun algunos murieron a consecuencia de la enfermedad.

VI.—Nuestras tentativas para infectar conejos, curies, ratas, ratones blancos y chacures (agutís) por inoculaciones intradérmicas e intraperitoneales de bartonella han dado todas resultados negativos.

VII.—Los monos (*Macaccus rhesus*) una vez infectados con cualquiera de nuestras cepas de *Bartonella bacilliformis* no desarrollaron verrugas al ser reinoculados por vía intradérmica. Estos monos también dejaron de desarrollar lesiones locales al ser reinoculados con una cepa peruana, lo que indica una relación estrecha entre la bartonella humana de Colombia y la del Perú.

S U M M A R Y

I.—From material obtained from patients in an epidemic in the Nariño Department (Colombia) a microorganism has been isolated which has been identified as belonging to the species *Bartonella bacilliformis* (Strong et al. 1915).

II.—A modification of Noguchi's medium for leptospira is described which permits a rapid growth and mass cultures of the organism. From such cultures homogeneous saline suspensions of *Bartonella bacilliformis* may be made which are considered of interest for future immunological work.

III. *Bartonella bacilliformis* in the blood of patients as well as cultured in Huntoon's medium can be preserved alive by the method of drying in the frozen state.

IV.—Inoculations of *Bartonella bacilliformis* in non immune-monkeys, *Macaccus rhesus* and *Cebus apella*, have given evidence of infection in 100% of the cases.

V.—The common dog locally called "gozque" has proven to be quite susceptible to experimental infection in almost all cases, many developed verrugae and some even died of the disease.

VI.—Our attempts to infect rabbits, guinea-pigs, rats, white mice and chacures (agutis) by intradermal and intraperitoneal inoculations of bartonella have all given negative results.

VII.—Rhesus monkeys once infected with any of our Colombian strains of *Bartonella bacilliformis* failed to develop verrugae on reinoculation into the skin. These monkeys reinoculated with a Peruvian strain also failed to develop local lesions indicating a close relationship between the human bartonella of Colombia and Perú.

BIBLIOGRAFIA

1. Noguchi, Hideyo y Battistini Telémaco S. J. Exp. Med. 1926, XLIII, 851.
2. Noguchi, H., J. Exp. Med. 1927, XLV, 175.
3. Noguchi, H., J. Exp. Med. 1926, XLIV, 533.
4. Noguchi, H., J. Exp. Med. 1927, XLV, 437.
5. Strong, R. P., Tyzzer, E. E., Sellards, A. W., Brues, C. T., and Gastiaburu, J. C., Report of first expedition to South America, 1913, Harvard School of Tropical Medicine, Cambridge, 1915.
6. Patiño Camargo Luis, Revista de Higiene del Ministerio de Trabajo, Higiene y Previsión Social de Colombia. 1939. IV, 4.
7. Jaramillo Raúl. Revista de Higiene del Ministerio de Trabajo, Higiene y Previsión Social de Colombia. 1939. VIII, 3.

8. Pittaluga, G. Bull. Inst. Pasteur, 1938. XXXVI, 961.
9. Lwoff A. y Vaucel M., Ann. Inst. Pasteur, 1931, XLVI, 258.
10. Tyzzer E. E. y Weinman D. Am. J. of Hyg. 1939, XXX, N^o 3. Sec. B, 141.
11. Pinkerton H., Weinman D. y Hertig M., Proc. Soc. Exper. Biol. & Med. 1937, XXXVII, 587-600.
12. Weinman D. y Pinkerton H., Ann. Trop. Med., Liverpool. 1938, XXXII, 215.
13. Expedición de la Escuela de Medicina de la Universidad de Harvard. 1937. Bol. Of Sanit. Panamericana. 1939. Año 18, N^o 9, 879.
14. Rebagliati Raúl. Boletín de la Dirección de Salubridad Pública del Ministerio de Salud Pública, Trabajo y Previsión Social. Perú. 1938. 25.
15. Franco F. Roberto y Almánzar Pedro José. Revista de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional, Colombia, 1939. VII, 515.
16. Escomel, E., Bull. Soc. Path. Exot. 1938. Año XXXI N^o 7. 536.
17. Harris, D. L., y Shackell, L. F., J. Am. Pub. Health Assn. 1911, I, 52.
18. Swift, Homer T., 1921. J. Exp. Med. XXXIII, 69.
19. Sawyer, W. A., Lloyd, W. D. M., and Kitchen, S. T., J. Exp. Med. 1929. L, 1.

