

ESTUDIOS SOBRE BARTONELLOSIS

BARTONELLOSIS MURINA. II.—CULTIVO DE LA BARTONELLA MURIS

POR VICTOR M. AYULO R.

*Departamento de Investigaciones.
Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.*

(Recibido para su publicación el 5 de Enero de 1948)

Uno de los problemas más discutidos y aún no resuelto es el que se refiere al cultivo de la *Bartonella muris*, ya que como dice Weinman (1) "Son extraordinariamente divergentes los resultados señalados por diferentes investigadores".

MAYER, BORCHARDT y KIKUTH (1) y, BATTISTINI y WEISS (2), en 1926 fueron los primeros en señalar la obtención del cultivo puro de la *Bartonella muris* in vitro.

HAAM, LAUDA y SORGE (1) en 1927; SCHILLING y SAN MARTÍN (1), METELKIN (1), BAYON (1) y NOGUCHI (4) en 1928; LWOFF y PROVOST (6), DINGER (1) y MAYER (1) en 1929; LWOFF y VAUCEL (7) y JUDENIC (1), en 1931; MARMORSTON y PERLA (8), RORDORFF (1) y COSSALI (1) en 1932 y LAWKOWICZ (9) (10) en 1938 y 1939, afirman igualmente haber cultivado la *Bartonella muris*, habiendo utilizado cada uno de ellos, con tal finalidad, diferentes medios de cultivo.

WEINMAN (1) después de hacer un estudio exhaustivo sobre los diferentes trabajos publicados por los investigadores antes mencionados, acerca del cultivo de la *B. muris*, llega a la conclusión de "que ninguno de los estudios sobre cultivos es completamente satisfactorio"

Por otra parte FORD y ELLIOT (11) en 1928, después de múltiples ensayos con el objeto de obtener el cultivo in vitro de la *Bartonella muris*, llegan a la siguiente conclusión: "Hasta ahora no hemos obtenido ningún cultivo satisfactoriamente y nos parece muy dudoso que dicho organismo haya sido jamás cultivado artificialmente".

BONIN y JONCHERES (12) en 1929 refiriéndose a la cultivabilidad de la *B. muris*, dicen: "Los ensayos de cultivo que hemos practicado en el medio de Noguchi han sido infructuosos".

McCLUSKIE y NIVEN (13) en 1934, igualmente, consideran la imposibilidad de cultivar a la *B. muris*, in vitro.

KIKUTH (14) en su informe al IX Congreso Internacional de Dermatología, celebrado en Budapest en setiembre de 1935, afirma que: "la *B. muris* no puede ser cultivada"; no obstante haber afirmado en 1926 con MAYER y BORCHARDT el haber cultivado a este micro-organismo.

WEINMAN (1) en 1944, refiriéndose a la posibilidad de cultivar a la *B. muris* in vitro dice: "Como las otras *haemobartonellas*, *H. muris* es un organismo difícil de cultivar".

Siguiendo el programa trazado de acuerdo con el Profesor Dr. TELÉMACO S. BATTISTINI sobre *bartonellosis murina*, estudiamos el capítulo referente al cultivo de la *B. muris* in vitro.

MATERIALES Y METODOS

Después de múltiples ensayos el medio que nos ha permitido obtener el cultivo de la *Bartonella muris*, es agar semi-sólido preparado en la forma siguiente:

Agar al 2 % (Ph: 7.2)	10.00 cc.
Suero hemolítico de rata	10.00 ..
Suero fisiológico al 8.5‰	80.00 ..
Suplement A.	0.05 ..

El agar utilizado en la preparación del medio que acabamos de describir, lo preparamos, a su vez, en la forma siguiente:

Extracto de carne	3	grs.
Peptona proteosa	10	„
Cloruro de sodio	5	„
Agar bacteriológico	20	„
Agua destilada	1000	cc.
Ph. 7.2		

Filtrar y esterilizar a 15 libras de presión durante 15 minutos.

Al agar preparado en esta forma y a la temperatura de 50°C., se le agrega el suero hemolítico de rata, el suero fisiológico y el Suplement A., en las proporciones que hemos indicado. Hecha la mezcla se reparte en tubos (4 cc. por tubo) los que se colocan a la estufa a 37°C. durante 24 horas para control de esterilidad.

Para la obtención de cultivos utilizamos ratas en pleno cuadro de bartonelosis, en las que el parasitismo globular con *B. muris*, está por encima del 50 %.

Iguamente empleamos solución de penicilina en suero fisiológico (200.000 unidades por cc.).

La técnica utilizada por nosotros, es la siguiente:

0.2 cc. (40.000 unidades) de la solución de penicilina se aspiran con una jeringa, con la que, así cargada, se realiza la punción cardíaca de la rata bartonelosa de la cual se desea obtener cultivos, previa anestesia al éter. Después de mezclar la solución de penicilina con la sangre del animal parasitado, se siembra una serie de tubos con el medio de cultivo que hemos indicado. Generalmente sembramos 6 tubos (1 gota a un tubo, 2 al 2º; 3 al 3º; 4 al 4º 5 al 5º y 6 al 6º). Después de sembrados, cada uno de los tubos, es agitado suavemente, para mezclar el inóculo con el medio de cultivo, evitando la formación de burbujas. Terminada la siembra, los tubos son colocados a la estufa a la temperatura de 28°C. A partir de las 48 o 72 horas de realizada la siembra cada uno de los tubos es examinado macroscópicamente primero y luego en preparaciones al ultramicroscopio.

Para la conservación de las cepas efectuamos los trasplantes cada 20 días, utilizando el mismo medio.

Con el fin de cerciorarnos que los organismos cultivados por nosotros eran capaces de reproducir la enfermedad, utilizamos 12 ratas que no presentaron *B. muris* en la sangre periférica después de la esplenec-

tomía, las que fueron controladas por exámenes hematológicos seriados cada 24 horas, por espacio de 7 días, con la finalidad de asegurarnos que estaban libres de infección con *B. muris*. Al término de este periodo las dividimos en 2 grupos (A y B) de 6 animales cada uno.

A cada una de las ratas del grupo A, les inyectamos por vía peritoneal 1 cc. de un cultivo de *B. muris* de 10 días (Cepa A1 de reciente aislamiento); quedando los animales del grupo B como control.

A partir de las 24 horas que siguieron a la inoculación, los individuos de cada uno de los grupos: A y B, fueron controlados por exámenes hematológicos seriados cada 24 horas por medio de frotises de sangre coloreados por el método de Wright.

RESULTADOS

Macroscópicamente a partir de las 48 o 72 horas de realizada la siembra, se puede observar por medio de una lupa o sin ella, la presencia de colonias, unas de forma esférica, otras irregulares de contornos difusos de 1 milímetro de diámetro más o menos, o más pequeñas. En el transcurso de los días se aprecia un aumento en el número de colonias, a la par que muchas especialmente las que se encuentran cerca de la superficie confluyen dando el aspecto de pequeñas nubes de color gris blanquecino o formando una especie de banda de color blanco grisáceo cerca de la superficie; aspecto semejante al que se observa en los cultivos de *Bartonella bacilliformis* en el medio de Battistini.

Al examen ultramicroscópico se aprecia la presencia de formas bacilares o cocobacilares aisladas, o colonias de contornos irregulares en las cuales los parásitos pueden ser individualizados solamente en la periferie.

Como dicen BATTISTINI y WEISS (2) "Las agrupaciones de elementos formando palizadas o colonias microscópicas, según el número de ellas, es la misma que se observa en los cultivos de la B. b."

Al examen ultramicroscópico, la *B. muris* es móvil.

Las estructuras espirales, descritas por BATTISTINI (1927) (3) y por NOGUCHI (1928) (5) que se observan en los cultivos viejos de *Bartonella bacilliformis*, no se observan en los cultivos viejos de *Bartonella muris*,

La *B. muris* se puede mantener en cultivos por trasplantes sucesivos en el medio que hemos indicado, no siendo necesario en estos casos el empleo de penicilina, ya que ésta la usamos exclusivamente para el aislamiento de las cepas.

El 100 % de los animales del grupo A, libres de infección con *B. muris*, a los que se les inyectó cultivos de este micro-organismo desarrollaron el cuadro de la bartonelosis murina, la que evolucionó tanto en lo que se refiere a la infección porcentual de glóbulos rojos, cuanto a la mortalidad, hemoglobinuria, etc., en forma semejante a la que hacen las ratas portadoras de *B. muris* después de la esplenectomía.

En 3 (50 %) la enfermedad se inició a las 24 horas de la inoculación; en 2 (33.3 %) a las 48 horas y en la última (16.7 %) a las 72 horas.

De las 6 ratas inoculadas 5 (83.3 %) murieron entre las 96 y 144 horas que siguieron a la inoculación.

Ninguno de los animales del grupo B (control), desarrollaron la enfermedad durante el tiempo que duró la experiencia. (166 horas).

DISCUSION

Una de las mayores dificultades en el estudio de la bartonelosis murina es la que se refiere al cultivo de la *Bartonella muris* in vitro.

A este respecto LAWKOWICZ (9) dice: "Es muy difícil de obtener in vitro el cultivo de *Bartonella*, a causa de su adaptación estricta a su existencia intracelular (glóbulos rojos). Esta dificultad constituye el mayor obstáculo a las investigaciones sobre la estructura de estos parásitos".

Otros estiman que tal dificultad es debida al pasaje de diversos gérmenes a la sangre circulante de las ratas después de la esplenectomía. Participan de esta opinión BATTISTINI y WEISS (2) quienes manifiestan lo siguiente: "Si no es en realidad difícil el cultivo de las bartonellas, estando habituados a las técnicas especiales que requiere, en el caso particular de la *B. m.*, la constante presencia en la sangre de las ratas de organismos del grupo *Salmonella*, hace que la obtención de cultivos puros sea bastante difícil".

PITALUGA (14), a su vez expone que: "No solamente en el caso de la *B. muris*, sino como hemos visto en los trypanosomas (*Tr. gambiense*,

rhodesiense, *cruzi*, *lewisi*, etc.) diversas bacterias, especialmente pasteurellas y salmonellas pueden exaltar su virulencia y determinar una invasión a la sangre después de la esplenectomía. En muchos casos que nosotros no deseamos enumerar, las inoculaciones con cultivos de *Bartonella* han sido hechos con cultivos impuros, infectados por bacterias diversas (de las cuales algunas han sido reconocidas, por ejemplo por NOGUCHI: *Bact. peruvianum*, *Bact. muris*)"

Nosotros creemos que en el caso de la *B. muris*, como en el de muchos otros micro-organismos, una de las dificultades con que se tropieza para la obtención de cultivos se debe a que no se les proporciona las condiciones necesarias para poder vivir artificialmente.

En el caso particular de la *B. muris*, la presencia del suero hemolítico de rata en el medio de cultivo, es a nuestro modo de ver, un factor fundamental para el desarrollo de este germen. Con tal finalidad la sangre de rata que utilizamos para la obtención del suero, la guardamos en el frigidaire, hasta que éste, esté hemolítico. Creemos que por la destrucción natural de glóbulos rojos, quedan libres en el suero una serie de sustancias (?) indispensables para la vida de este germen.

No obstante que la mayor parte de investigadores aseguran que las contaminaciones de los cultivos se debe a la presencia en la sangre de la rata bartonellósica, de gérmenes del género *Salmonella* o *Posteurella*; la mayor dificultad con que hemos tropezado en un principio, ha sido debida a la frecuente contaminación de nuestros cultivos con *Staphylococcus*.

En vista de que el empleo de grandes dosis de penicilina, no modifica el curso normal de la bartonellosis murina, ni impide que las ratas portadoras de *B. muris* desarrollen la enfermedad después de la esplenectomía (15) y estando ampliamente demostrada la acción bacteriostática que ejerce la penicilina sobre determinados gérmenes como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, etc. utilizamos la mencionada droga con la finalidad de obtener cultivos puros de *B. muris*.

La presencia de penicilina en los medios de cultivo juega un papel muy importante inhibiendo el desarrollo de los micro-organismos antes señalados, sin afectar en lo más mínimo el desarrollo de la *B. muris*.

La inoculación de los cultivos de *B. muris*, obtenidos en la forma que hemos expuesto, en ratas libres de infección con este organismo, reproduce el cuadro de la bartonelosis murina en forma semejante a la que desarrollan las ratas portadoras de *B. muris* al ser esplenectomizadas.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

Del estudio que hemos hecho acerca del cultivo de la *Bartonella muris* in vitro, llegamos a las siguientes conclusiones:

- 1.—La *Bartonella muris* es un organismo cultivable.
- 2.—Hacemos la descripción de un medio en el que hemos cultivado a la *B. muris*
- 3.—La presencia del suero hemolítico de rata en la preparación del medio de cultivo, es fundamental para el desarrollo de la *B. muris*.
- 4.—El empleo de penicilina inhibe el desarrollo de gérmenes como el *Staphylococcus* que contaminando los cultivos impiden el desarrollo de la *B. muris*
- 5.—La penicilina no inhibe el desarrollo de la *B. muris*.
- 6.—La inoculación de cultivos de *B. muris*, por vía peritoneal en ratas libres de infección con este micro-organismo, hace que estas desarrollen el cuadro de la bartonelosis murina.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The following conclusions are derived from the *in vitro* study of *Bartonella muris*:

- 1.—*In vitro* culture of *Bartonella muris* is readily feasible.
- 2.—A culture medium for *B. muris* is described.
- 3.—Presence of rat haemolyzed serum in such medium is essential for the growth of *B. muris*.
- 4.—Using Penicillin in the inoculation of culture media prevents growth of contaminating organisms, such as *Staphylococci*, which inhibit growth of *B. muris* in such media.
- 5.—Penicillin does not inhibit growth of *B. muris* *in vitro*.
- 6.—Intraperitoneal inoculation of *B. muris* cultures in rats free of *Bartonellae* induces development of murine bartonelosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. WEINMAN, D.: "*Infectious Anemias due to Bartonella and Related Red Cell Parasites*". Reimpreso de *Transactions of the American Philosophical Society*, New Series: Vol. XXXIII, Part III, Segunda Edición, Philadelphia Lancaster Press Inc., Pennsylvania 1944.
2. BATTISTINI, T. & WEISS, P.: *Facultad de Medicina de Lima. Laboratorio de Investigaciones*, 1926.
3. BATTISTINI, T.: *An. de Fac. de Med. Lima.*, 10: 243, 1927.
4. NOGUCHI, H.: *J. Exper. Med.*, 47: 235, 1928.
5. NOGUCHI, H.: *J. Exper. Med.*, 47: 219, 1928
6. LWOFF, A. & PROVOST, A.: *C. R. Soc. Biol.*, 101: 8, 1929.
7. LWOFF, A. & VAUCEL, M.: *Ann. Inst. Pasteur.*, 46: 258, 1931.
8. MARMORSTON, J. & PERLA, D.: *J. Exper. Med.*, 58: 763, 1932.
9. LAWKOWICZ, W.: *Bull. Office internat. d'hyg. publ.*, 30: 1781, 1938.
10. LAWKOWICZ, W.: *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 32: 601, 1939.
11. FORD, W. W. & ELLIOT, P. C.: *J. Exper. Med.*, 47: 475, 1928.
12. BONIN, H. & JONCHERES, H.: *C. R. Soc. Biol.*, 101: 681, 1929.
13. MC CLUSKIE, J. A. W. & NIVEN, J. S. F.: *J. Path. and Bact.*, 39: 185, 1934.
14. PITTALUGA, G.: *Bull. Inst. Pasteur.*, 46: 961, 1938.
15. AYULO, R. V. M.: *Rev. Med. Exper.*, 7: 26, 1948.