

ACCION IN VITRO DE LA CLOROMICETINA SOBRE LA *BARTONELLA BACILLIFORMIS*

GERMÁN BATTISTINI M. y ABILIA TICSE

Departamento de Investigaciones Médicas del Instituto
Nacional de Higiene y Salud Pública, Lima

(Recibido para su publicación el 2 de Noviembre de 1949).

Desde la aparición de los primeros antibióticos, los investigadores peruanos se han esforzado por determinar la acción terapéutica que dichas substancias pudieran tener sobre la verruga peruana o Enfermedad de Carrión, especialmente en vista de que aún la Ciencia Médica no dispone de específico alguno sobre esta grave dolencia. Es así como la penicilina ha sido ensayada, al parecer con bastante buenos resultados (1) tanto *in vivo* con pacientes de verruga, así como también *in vitro* sobre el agente etiológico de la Enfermedad de Carrión, la *Bartonella bacilliformis*. Desde que la *B. bacilliformis* es un germen gram-negativo, era natural esperar mejores resultados aún con antibióticos como la Estreptomicina y la Cloromicetina, ya que éstos —a diferencia de la penicilina— actúan también sobre el grupo de los gram-negativos. La Estreptomicina ha sido estudiada anteriormente por uno de los autores (2) en cuanto a su acción *in vitro* sobre la *B. bacilliformis*, encontrando que es bacteriostática a partir de una décima de gamma por centímetro cúbico de diluyente, si es que el germen permanece en contacto con el antibiótico por espacio de 48 horas o más. En 1949 iniciamos similares estudios con la Cloromicetina, habiendo comunicado en forma preliminar (3) los primeros resultados obtenidos; y ahora, después de haber repetido varios experimentos, ofrecemos en el presente artículo las conclusiones a que hemos llegado sobre este particular.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cloromicetina. Constituyó para nosotros una verdadera primicia el poder disponer de pequeñas cantidades de este antibiótico desde los pri-

meros días de 1949, gracias a la gentileza del Dr. Julio Muñoz Puglisevich, quien nos la proporcionó después de haberla obtenido de la casa Parke Davies. La forma de presentación fué de tabletas que contenían 250 miligramos de droga, o sea 250.000 gammas por tableta.

Cepas de Bartonella bacilliformis. Empleamos tan solo una cepa de este organismo, la que había sido mantenida *in vitro* en el laboratorio por espacio de varios años.

Medios de cultivo. A fin de obtener suspensiones del germen, en lo posible libres de partículas de agar u otras sustancias extrañas, usamos el medio agar-sangre (33 % sangre de conejo). Para las pruebas de la acción antibiótica de la Cloromicetina, en cambio, preferimos el medio semi-sólido de NOGUCHI, para leptospira (4), debido a que en éste es posible observar con mayor facilidad el desarrollo de la *B. bacilliformis*.

Con el objeto de interpretar mejor los resultados de nuestros estudios acerca de la acción antibiótica de la Cloromicetina sobre el agente etiológico de la Enfermedad de Carrión, nos parece necesario recordar las características del desarrollo de este germen en ambos medios de cultivo usados, por lo que nos limitamos a repetir lo descrito en otra oportunidad (2).

Medio sólido o agar-sangre. "El desarrollo se efectúa especialmente en la superficie del medio, caracterizado por colonias sumamente pequeñas en los primeros días de incubación a 28°C., circulares, brillantes, grisáceas (observación hecha mediante la ayuda de una lupa). Hacia el cuarto día algunas de ellas se hacen perfectamente visibles sin el auxilio de lente de aumento, alcanzando diámetros cercanos al milímetro. A la observación al campo oscuro (ultra-microscopio), hay un predominio de la forma bacilar típica en los primeros días y gran movilidad (flagelos demostrados por primera vez por NOGUCHI en 1928 (5). En los días sucesivos la bartonella se hace cocoide; fenómeno que se acompaña con la desaparición de la movilidad".

Medio semisólido de NOGUCHI. "En este medio de cultivo, H. NOGUCHI y T. BATTISTINI (6) en 1926 aislaron por primera vez la *B. bacilliformis*. Este germen desarrolla, dando entre las 48 y 96 horas, colonias muy pequeñas, sólo apreciables con una lupa de aumento. Parece además, que hubiera una zona de mayor predominio de desarrollo a medio-centímetro de la superficie. Hacia el cuarto día, ya se puede observar a

simple vista, masas pequeñas de cierta densidad, y a la apreciación con una lente de aumento, dichas masas o colonias tienen morfología esférica con el centro opaco y la superficie clara. Hacia el sexto y sétimo día, el desarrollo es francamente visible, algunas de las colonias alcanzan tamaños cercanos al milímetro, persistiendo la agrupación en la zona anteriormente indicada, formando (no siempre) una especie de plano o capa circular. Es necesario aclarar que influye mucho para el pronto y abundante desarrollo respectivo, la vitalidad del inóculo. Además, como el medio contiene hemoglobina (glóbulos rojos lisados), hay con frecuencia un ligero cambio de coloración del tono rojizo al violáceo, más apreciable a partir de la zona de mayor abundancia de colonias hacia abajo. Este medio es el que hemos usado en el presente estudio, pues creemos que se presta mejor para la observación de la acción antibiótica, ya que la apreciación del desarrollo se hace: primero, por la visión perfectamente clara de las colonias características en su debido tiempo de cultivo; y segundo, por la rápida identificación al ultramicroscopio, de la bartonella con su morfología típica".

Método. Conociendo el índice de solubilidad en agua de la Cloromicetina, que es de 2,5 miligramos por centímetro cúbico a 25°C., procedimos a preparar diluciones sucesivas del antibiótico en solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.85 %) estéril, de acuerdo a la escala que indica el cuadro N° 1. Según éste, las diluciones varían desde 0.48 a 250 gammas por cc. Simultáneamente en cada serie de experimentos se usó un tubo de solución salina fisiológica sin Cloromicetina, a manera de control.

El volumen total de cada dilución fué de 1 cc. Después de hechas las diluciones se agregó a cada tubo 0.1 cc., de una suspensión de bartonellas, preparadas mediante un lavado con solución salina fisiológica estéril, de un cultivo en medio agar-sangre y de cuatro días de incubación a 28°C. Inmediatamente después de poner en contacto las bartonellas con las respectivas diluciones de Cloromicetina, se hizo el primer cultivo en el medio semisólido de NOGUCHI; el segundo se realizó a las 24 horas de encontrarse el germen en contacto con el antibiótico; el 3º, a las 48 horas; y el 4º, a las 72 horas. Tanto los medios inoculados como las soluciones de antibiótico y gérmenes fueron conservados a 28°C.

Cuadro I.—Diluciones de la Cloromicetina, usadas en el estudio de la acción de este antibiótico sobre la Bartonella bacilliformis.

Tubo N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloromicetina en gammas por cc.	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.95	0.97	0.48	0.00

Resultados: (Cuadro II). Las inoculaciones realizadas inmediatamente después de puestos en contacto gérmenes y antibiótico mostraron desarrollo bacteriano desde las dosis correspondientes a 15.6 gammas por cc.; entre tanto que las dosis mayores actuaron inhibiendo dicho desarrollo. Las inoculaciones verificadas 24 horas después, mostraron actividad positiva del antibiótico hasta la dosis de 7.8 gammas por cc.; la inoculación de las 48 horas y 72 horas dió actividad positiva sobre el germen hasta 3.9 gammas por cc.; las dosis menores ya permitieron el desarrollo de las bartonellas con las características descritas y semejantes al tubo control sin antibiótico. Estas experiencias fueron repetidas varias veces con el mismo lote de Cloromicetina, con resultados siempre semejantes.

Las observaciones de los cultivos se hicieron a partir del cuarto día, época en la cual el desarrollo fué manifiesto en el tubo de control (sin antibiótico). La apreciación del desarrollo no sólo fué hecha macroscópicamente, sino también al examen ultra-microscopio. En ningún momento hemos observado alteraciones morfológicas de la *Bartonella bacilliformis*, semejantes a lo que sucede con la penicilina (7), a excepción de las que normalmente se aprecian durante el curso de su desarrollo en los medios descritos.

Cuadro II.—Inhibición del desarrollo de la Bartonella bacilliformis, in vitro, por acción de la Cloromicetina

Cultivo*	Diluciones de la Cloromicetina (gammas por 1 cc.)										Control
	250	125	62.5	31.2	15.6	7.8	3.9	1.95	0.97	0.48	
Inmediatamente											
después	0	0	0	0	x	x	x	x	x	x	x
24 horas	0	0	0	0	0	0	x	x	x	x	x
48	0	0	0	0	0	0	0	x	x	x	x
72	0	0	0	0	0	0	0	x	x	x	x

0: falta de desarrollo.

x: desarrollo bacteriano.

* Cultivo: tiempo de estar la *Bartonella bacilliformis* en contacto con el antibiótico.

RESUMEN

Se ha estudiado la acción *in-vitro* de la Cloromicetina sobre la *Bartonella bacilliformis*, y se encuentra que ella inhibe el desarrollo de dicho germen.

Primero: a la dosis de 3.9 gammas por cc. después de 48 horas de contacto del germen con el antibiótico. Dosis menores de la señalada no ejerce acción inhibitoria aún 72 horas después. Dosis mayores, como 31.2 gammas por cc. actúa en forma inmediata, y 15.6 gammas por cc., 24 horas después de estar en contacto el germen con el antibiótico.

Segundo: no se observa alteraciones en la morfología de la *Bartonella bacilliformis* por acción del antibiótico. De todo lo cual se deduce que la Cloromicetina debe resultar de gran valor en el tratamiento de la Enfermedad de Carrión.

SUMMARY

The *in vitro* action of *Chloromycetin* (Chloramphenicol) on *Bartonella bacilliformis* was studied, disclosing the following:

1. *Bartonella bacilliformis* was inhibited by a threshold concentration of 3.9 gammas/cc. after 48 hours of contact with the antibiotic.
2. No morphological changes were observed on *B. bacilliformis* under the action of the antibiotic. These studies suggest that Chloromycetin might be of great value in the treatment of Carrion's Disease.

BIBLIOGRAFÍA

1. ALDANA, L. y TISNADO, S.: *Rev. Méd. Peruana*, 18: 343, 1945.
2. BATTISTINI M., GERMÁN, MUÑOZ PUGLIESEVICH, J. y TISNADO, M. S.: *Arch. Peruanos Patol. y Clin.*, 1: 663, 1947.
3. BATTISTINI M., GERMÁN y TICSE, ABILIA: Comunicación presentada en la 53ª reunión del Viernes Médico (Instituto Sanitas, Lima), Set., 1949.
4. NOGUCHI, H., MULLER, H. R., TORRES, O., SILVA, F.; MARTINS, H., RIBEIRO DOS SANTOS, A., VIANNA, G. y BIAO, M.: *Mon. Rockefeller Inst. for Med. Res.*, 20: 10, 1924.
5. NOGUCHI, H.: *J. Exper. Med.*, 47: 219, 1928.
6. NOGUCHI, H. y BATTISTINI, T.: *J. Exper. Med.*, 43: 851, 1926.
7. ALDANA, L.: *Rev. Sanidad Pol.*, 5: 26, 1945.