

METODO DE CULTIVO SUPERPUESTO PARA LA BARTONELLA BACILLIFORMES*

HÉCTOR COLICHÓN A., ALEJANDRO COLICHÓN Y., y CORSINA VELAZCO D. **

INTRODUCCION

Objetivo fundamental de esta nueva técnica es incrementar, en la mayor escala posible, el cultivo de la *Bartonella bacilliformis* (1) con el fin de producir apreciables cantidades de desarrollo y obtener antígenos en cantidades adecuadas que permitan llevar a cabo estudios inmunoserológicos en la Enfermedad de Carrión.

Fueron Noguchi y Battistini quienes, en 1926 (2), cultivan por primera vez a la *B. bacilliformis* en el medio que ellos venían empleando para la *Leptospira ictero hemorrágica*, medio que se conoce como "medio leptospira". En 1929, se señala a los medios corrientes como adecuados para el cultivo del microorganismo; Aldana (3) emplea con éxito el caldo infusión corriente para el cultivo de la sangre del enfermo verrucoso. Un nuevo medio fue estudiado y publicado por Geiman (4) en 1940, el medio puede ser líquido o sólido, pero, en todo caso, emplea la tryptona en vez de las peptonas comunes, medios a los que agrega suero de conejo, glutatión y ácido ascórbico. Para este autor, un medio así preparado resulta adecuado para producir antígenos para aglutinación.

Otros autores en diferentes épocas se han ocupado del tema del medio de cultivo de la *Bartonella*; sin embargo, la técnica que presentamos en este trabajo pone en evidencia nuevas características del desarrollo que no aparecen en las técnicas conocidas (3, 4) a la vez que

* Nota preliminar entregada para su publicación el 15 de set. de 1966.

** Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

se produce crecimiento considerable en el que se pueden apreciar colonias gigantes y microcolonias en la superficie del medio sólido su-
perpuesto, demostrándose que no es precisamente hemoglobina ni san-
gre total lo que el microorganismo requiere, sino ciertos factores difu-
sibles a través del agar son los que determinan su mejor desarrollo.

MÉTODOS

PREPARACIONES PRELIMINARES

CALDO TP:

Tryptosa Difco (B 124)	15 gm.
Cloruro de sodio Q. P.	5 gm.
Fosfato disódico anhidro	2.5 gm.
Agua destilada	1000 ml.
pH	7.0

Esterilizar a 15 libras por 20 minutos.

Después de autoclavar se deja sedimentar 1 o 2 días, luego decantar y a este decantado se agrega 15% de plasma de carnero y distribuir asépticamente. Control de esterilidad 37°C - 24 a 48 horas.

AGAR TP:

Al caldo anterior no autoclavado se agrega Agar Difco (B 140) en la proporción de 13 gm. por mil de caldo. pH 7.0 remojar una hora. Autoclavar. Cuando la temperatura es de 45°C se agrega 15 ml. de plasma por 100 de agar TP.

MEDIO BORDET GENJOU (modificado)

Infusión de papa (b)	1000 ml.
Glicerina Q. P. Merck	10 ml.
Cloruro de Sodio Q. P.	5.4 gm.
Proteosa Peptona N° 2, Difco (B 121)	10.0 gm.
Bacto Agar Difco (B 140)	14.0 gm.

Remojar una hora. pH 7.0

Autoclavar a 15 x 20, cuando la temperatura es de 45°C se agrega 15 ml. (por 100) de sedimento globular (SG).

a) Puede usarse Bacto Peptona, Difco (B 118)

b) Picar finamente 250 gm. de papa blanca *, colocándola en una boi-
sa de gasa (doble o triple) se le sumerge en 1000 ml. de agua destilada a la
que se agregan 10 ml. de glicerina indicados en la fórmula. Se hierve 30

* En el Perú hay papas amarillas, moradas, etc.

minutos se restituye el agua perdida por evaporación lavando la bolsa suspendida.

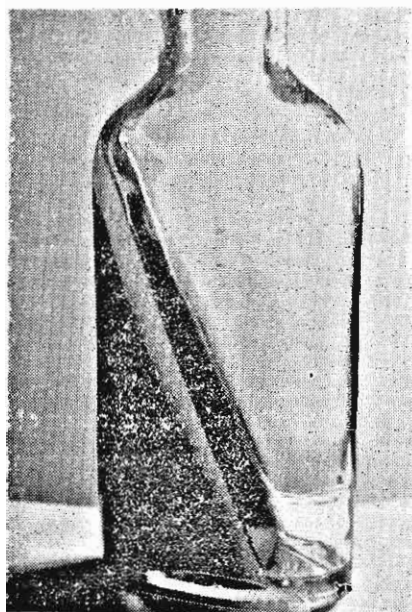
PLASMA DE CARNERO Y SEDIMENTO GLOBULAR (SG)

A un frasco graduado de 500 ml. se le agregan 3 gramos de Citrato de sodio ($5 \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$, Merck), el frasco (que es el mismo que se usa en la clínica para aplicar soluciones fisiológicas en la vena de los pacientes) lleva un tubo de vidrio corto cuyo extremo está dentro del frasco y por el otro está acoplado a un tubo de goma cuyo extremo lleva un trocar de calibre 12-14. El sistema se autoclava a 15 x 20 y sirve para obtener 400 a 500 ml. de sangre de un carnero sano.

Obtenida la sangre se reparte y se le centrifuga con el objeto de separar la mitad de su volumen de plasma (PC), dejando un sedimento de hematíes con el resto de plasma (SG).

PREPARACION DEL MEDIO SUPERPUESTO

1) A 1000 ml. de Agar Bordet Genjou aún fluido y a 45°C se agrega 150 ml. de sedimento celular (SG) que se mezcla por agitación. Mezclando sin hacer espuma o burbujas el agar sangre se reparte en frascos estériles de 200 ml. cantidades de 80 a 100 ml. de medio, luego se inclinan los frascos de costado en cajas o canastas de alambre preparadas para este fin. Inclinando los frascos de costado (fig. 1) se dejan enfriar y endurecer.



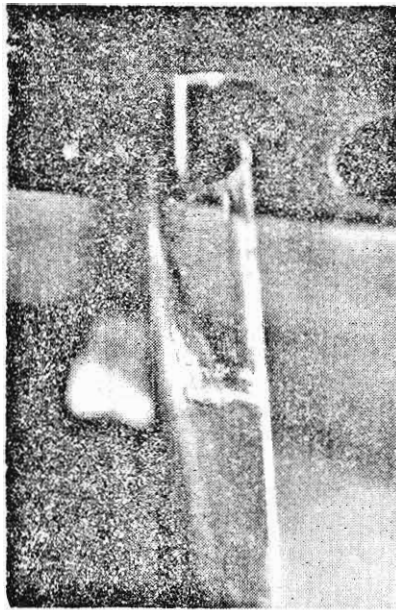
2) Al medio "Agar TP" fundido o recién preparado cuando aún está fluido y a 45°C se le agrega 15% de plasma (PC); mezclar y luego agregar a los frascos cantidades de 12 a 15 ml.

Volver a inclinar para superponer una capa de poco espesor. Se deja endurecer. (En tubos (180 x 20) se colocan 10 ml. de agar sangre Bordet. se inclinan y luego se recubren con 2 a 1.5 ml. de Agar TP recién preparado). (Fig. 1).

3) Finalmente, cuando los medios sólidos superpuestos están completamente duros, se agrega asépticamente 25 a 30 ml. de "Caldo TP" por frasco. Incubar a 37°C para su control.

LA SIEMBRA:

Para la obtención de antigeno se siembra cada frasco con 1 a 2 ml. de un cultivo de caldo de otro frasco de 6 a 9 días de incubación (a 28-29°C). Antes de sembrar se agita el frasco inóculo por suspender el sedimento. Se incuba 7 a 9 días a 28-29°C. Si se siembra sangre de pacientes o portado-

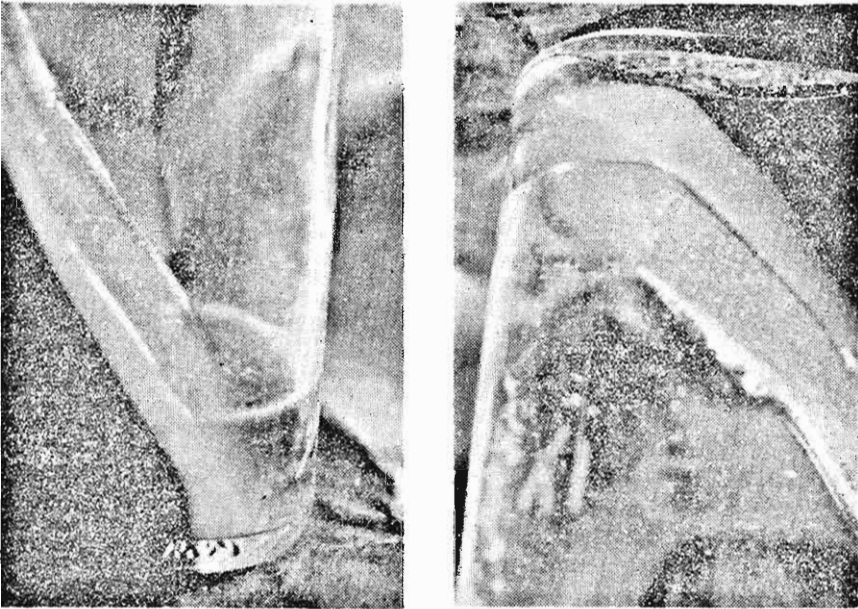


res es preferible usarla citratada (al 0.6 a 0.75% de citrato). Si se siembra tubos (fig. 2), la sangre se diluye en la proporción de 1.5 ml. por 10 ml. de caldo TP y luego se distribuye en cuatro o más tubos.

R E S U L T A D O S

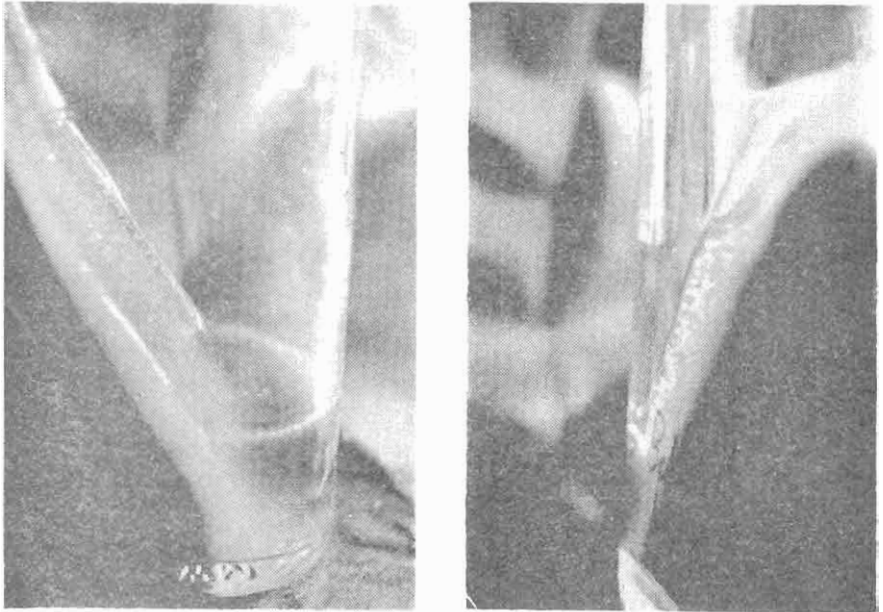
CARACTERES DEL CRECIMIENTO:

El desarrollo puede aparecer desde dos a tres días de incubación. En el caldo aparece ligerísima turbiedad o se observan gránulos blanquecinos o incoloros flotantes que, a veces, se pegan a las paredes del recipiente (Fig. 2). A medida que los días avanzan aumenta la turbiedad o la floculación y a los siete a nueve o más días, el crecimiento da lugar, en gran número de frascos o tubos, a la formación de una película fragmentada, algo así como si se tratara de *témpanos que flotan* en la superficie del líquido (figs. 3, 4, 5) y que algunos de estos fragmentos adhieren a las paredes (fig. 2). Es importante anotar que



debajo de estos fragmentos flotantes se observa con frecuencia una sustancia algo mucilaginosa poco detectable, que también se encuentra en el sedimento del cultivo en la cual microscópicamente se observan las grandes masas microbianas de la *Bartonella*.

En los dos primeros días es conveniente regar la superficie del agar con la parte líquida; las colonias pueden aparecer desde cuatro a cinco días. A los 7 o 9 días tales colonias han desarrollado bien, son de



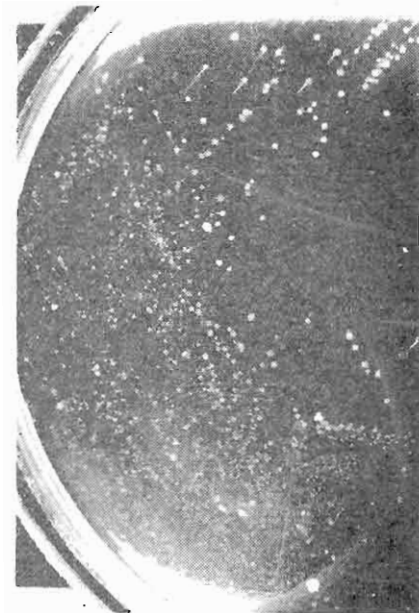
diferentes tamaños (fig. 6, 7) siendo blanquecinas o incoloras redondeadas, algo acuminadas y adherentes al medio; por su aspecto se parecen a las colonias de *Bordetella pertusis*, llamando la atención la diversidad de tamaños habiendo muy pequeñas que apenas se observan y otras demasiado grandes que a veces hacen dudar de la pureza del cultivo. Las colonias medianas intermedias son las que predominan.

Observando al microscopio el desarrollo en el Agar TP superpuesto, se observa en ciertas cepas o casos, infinidad de microcolonias como si se tratara de las formas "L" (PPLO) de la *Bartonella bacilliformis* que crecen interpuestas entre las colonias gigantes.

DISCUSION

El método del cultivo superpuesto para la *Bartonella bacilliformis* se basa en el pasaje a través de la capa de agar de sustancias, prin-

cipios o factores contenidos en la sangre fresca. En el agar TP superpuesto las colonias crecen mucho más que en el mismo medio no superpuesto. Lo mismo ocurre en el caldo TP, que sólo cuando está superpuesto da lugar al crecimiento en película fragmentada o témpanos, lo cual no ocurre en caldo TP no superpuesto o en el caldo tryptona-glutation-ácido ascórbico (4) o en los medios líquidos de otros autores que hemos reproducido y comparado en repetidos experimentos. En los cultivos de primer aislamiento en caldo (3) infusión corriente que lleva plasma del propio paciente hay desarrollo limitado que no llega a la formación de película ni de "témpanos flotantes". No hay



referencia en los trabajos de los autores nacionales y extranjeros de tal forma de desarrollo. El cultivo en el Medio Leptospira da lugar a colonias granulares, a veces turbiedad en una zona próxima a la superficie del medio; en el caldo Tryptona glutatión ascórbico tampoco se observa película ni "témpanos flotantes"; no hay referencia de que en otros medios líquidos ocurra.

En cuanto a los medios sólidos tampoco puede encontrarse colonias de las dimensiones y el número que se observan en el medio su-

perpuesto. Se han hecho estudios comparativos de este medio con los de Geimann (4) encontrándose que el rendimiento en antígeno es muy inferior al del medio superpuesto que proponemos.

El medio superpuesto rinde desarrollo en la parte líquida y desarrollo en la parte sólida lo que da lugar a una mayor cantidad de antígeno bacteriano.

El desarrollo en la parte sólida es muy adherente, siendo necesario remojar el desarrollo de agar con el agua de condensación para poder despegar las colonias lo que generalmente hacemos con espátula.

La recolección del cultivo en el caldo de condensación permite reunir el desarrollo de 100 o 200 placas que rinde aproximadamente 2 a 5 litros que se les puede centrifugar en una super-centrifuga Serval modelo SS-1 a flujo continuo, obteniéndose grandes cantidades de sedimento microbiano o antígeno.

CONCLUSIONES

1) El medio de cultivo superpuesto, tal como se describe, permite obtener grandes cantidades de masa bacteriana de *B. bacilliformis*.

2) En la parte líquida del medio, la *B. bacilliformis* produce película fragmentada semejante a "témpanos flotantes".

3) El antígeno que se obtiene en el medio superpuesto está libre de los pigmentos sanguíneos.

4) El tamaño de las colonias desarrolladas es muy variable y diverso habiendo entre las colonias macroscópicas, microcolonias tipo "L", que sólo se observan al microscopio.

BIBLIOGRAFIA

1. Strong R. P.; Tyzzer, E. E. and Sellards, A. W. Jour. Amer. Med. Asso. 64, 808, 1915.
2. Noguchi, H. and Battistini T. Jour. Exp. Med. 43, 651, 1926.
3. Aldana, L. La Crón. Med. Lima 46, 235, 1929.
4. Geiman Q. M., Proc. Soc. Exper. Biol and Med. 47, 329-332, 1941.