

ENFERMEDAD DE CARRION (BARTONELLOSIS HUMANA)

Estudio morfológico de la Fase Hemática y del Período Eruptivo con el Microscopio Electrónico*

JUAN TAKANO MORÓN **

Después del descubrimiento del agente etiológico de la Enfermedad de Carrion por Barton, surgen ideas y opiniones respecto a la naturaleza del germen. Gastiaturú y Rebagliati (11) creen que los Cuerpos Endoglobulares de Barton son protozoarios, mientras que Monge (28) piensa que se trata de alteraciones de los glóbulos rojos debido a trastornos de los órganos hematopoyéticos. En 1913, Mayer y colaboradores (24) describen "inclusiones celulares" en las lesiones verrucosas y sugieren que se trata de clamidozoarios, lo que dá lugar a que la Comisión Investigadora de la Universidad de Harvard presidida por Strong, concluya que la Fiebre de la Oroya y la Verruga Peruana (erupción verrucosa) son dos enfermedades diferentes, la primera producida por la *B. bacilliformis* y la segunda por un virus.

En 1922, Mackehenie y Battistini (21) dicen haber encontrado, en preparaciones verrucosas, Bartonella en forma de haitera o palanquetas y señalan la similitud entre la Bartonella y la Rickettsia. En 1925, Noguchi y Battistini (29) cultivan la *B. bacilliformis* de un caso de Fiebre de la Oroya; poco después, Noguchi (30) cultiva el mismo organismo de lesiones verrucosas producidas experimentalmente en monos, demostrando que el agente etiológico de la Fiebre de la Oroya y de la Verruga Peruana es un mismo germen, hecho que practicamente había sido demostrado 35 años antes, con el sacrificio de Carrion. En 1927, Battistini (5) estudia la morfología de la *Bartonella bacilliformis* que desarrolla en medios de cultivo; describe formas cocoides, bacilares y diplococobacilares, señalando que las formas cocoides son formas degenerativas propias del envejecimiento del cultivo.

La primera observación de la *Bartonella bacilliformis* obtenida de medios de cultivo, con el microscopio electrónico, usando la técnica del sombreado al vacío, fue hecha por Peters y Wigand (33) y, algunos años después, repetidas por Pérez Alva y Giuntini (32). Estos autores concluyen que el germen de la Enferme-

* Esta investigación ha sido financiada con el donativo N° CA-0055 del Servicio de Salud Pública de los Estados Unidos y el donativo N° DA-ARO-49-092-65-G-91 de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos. Presentada para optar el grado de Doctor en Medicina. Agosto de 1970, U.N.M.S.M.

** Profesor Asociado de Patología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

dad de Carrión es una bacteria con flagelos unipolares y que se dividen por partición binaria.

En la Anemia Grave de Carrión (3), otrora conocida con el nombre de Fiebre de la Oroya, Barton (4) se refiere a la existencia de "cuerpos endoglobulares", Strong y colaboradores (44), el año de 1913, confirman el hallazgo de Barton y proponen la creación del género *Bartonella* dando el nombre de *Bartonella bacilliformis* a la especie en mención. A partir de esta época, el germen de la Enfermedad de Carrión es considerado como un micro-organismo de localización intraglobular hasta que, Aldana (1), en 1929, sostiene que la *Bartonella bacilliformis* es un germen inmóvil adherido a la superficie de los glóbulos rojos, desconociendo la teoría de la localización endoglobular de Barton. El mismo autor, en su monografía sobre la biología de la *Bartonella bacilliformis* (2), insiste y sostiene sus ideas sobre la relación hemató-Bartonella y la forma como este complejo interviene en el mecanismo de la Anemia de Carrión. Wigand y colaboradores (53), en 1953, estudian con el microscopio electrónico réplicas de glóbulos rojos parasitados por *B. bacilliformis* y concluyen que el germen se encuentra sobre la superficie del hematíe. Recientemente, Cuadra y Takano (7) han demostrado, en secciones delgadas de glóbulos rojos de pacientes con anemia de Carrión, usando el microscopio electrónico, la localización endoglobular de la *Bartonella bacilliformis*.

Parece que la primera descripción del cuadro histológico de la lesión verrucosa cutánea de la Enfermedad de Carrión se debe a Vélez, descripción que aparece en su tesis de bachiller publicada en el año de 1861 (49). En 1898, Odriozola publica su monografía: La maladie de Carrión du la verruga peruvienne (31), en la que menciona el cuadro histológico de los tumores verrucosos describiéndolos como "pequeños sarcomas fibrosos" de acuerdo con los trabajos de Cornel, Dounen y Renaut. Odriozola también se refiere a los trabajos de Letulle quien describe en las verrugas cutáneas, inflamación aguda y subaguda del dermis y la hipodermis, edema e hiperplasia de las células endoteliales. Tamayo, en su tesis, publicada el año de 1899 con el nombre de Histología Patológica de la Verruga Nodular (46), denomina la lesión "Noduloma de Carrión" y la considera como una lesión inflamatoria causada por el germen "verrucógeno". En 1901, Herculles (16) se refiere a la histogénesis de la lesión verrucosa y la considera como de origen vascular. El siguiente año, Escobel (9) lanza su "teoría celular" en oposición a la "teoría vascular" de Herculles en lo que respecta a la histogénesis de la lesión eruptiva de la Enfermedad de Carrión. En 1913, Mayer y colaboradores (24) señalan la naturaleza angioblástica del verrucoma y describen inclusiones celulares que las consideran como clamidozoarios. En 1914, Herculles (17) demuestra la presencia de estroma laxo y de elementos celulares angioblásticos en el botón verrucoso. En 1926, Mackehenie y Weiss (22), sostienen que el verrucoma se origina por proliferación de histiocitos los que, por diferenciación, se transforman en células endoteliales. Estos autores se refieren también a estructuras similares a Rickettsias las que, por sus dimensiones y características, son comparables a la *B. bacilliformis* de la Fiebre de la Oroya. En 1938, Mackehenie (22) interpreta las inclusiones descritas en los verrucomas por Ma-

yer y colaboradores como formas de *Bartonella bacilliformis*. Recientemente Urteaga y Calderón (47), en secciones histológicas de verrucomas coloreadas con Giemsa, demuestran células histioides cargadas de gránulos que son señalados como formas cocoides de *B. bacilliformis*.

El avance en el conocimiento morfológico de la Enfermedad de Carrión permitió a Weiss (51), el año de 1926, lanzar una concepción patogénica de la enfermedad. Weiss considera una primera fase de la enfermedad que denomina Fase Hemática y que corresponde a la llamada Fiebre de la Oroya. En esta primera fase habla de un primer período caracterizado por hipoergia o anergia del paciente, de eritrocitos parasitados por *Bartonella bacilliformis*, de eritrofagia a nivel del Sistema Reticulo Endotelial y de regeneración eritroide medular y, de un segundo período que denomina "Crisis Sanguínea" caracterizado por la desaparición progresiva de eritrocitos parasitados. La segunda fase de Weiss es la Fase Histioides o verruga propiamente dicha en la que considera la acción del germen sobre los tejidos. En esta fase se refiere a un Período Pre-eruptivo que corresponde al período intercalar de Odriozola en el que la reacción tisular es difusa y, a un Período Eruptivo caracterizado por la presencia de nódulos angioblásticos de los tegumentos con máxima resistencia a la enfermedad y linfocitosis. Weiss, también se refiere a las formas inaparentes de la enfermedad con hemocultivos positivos para *B. bacilliformis*. En una última revisión sobre esta enfermedad, el autor en mención (52), señala que esta enfermedad se asemeja en su cuadro nosológico, más que ninguna otra, al de las enfermedades eruptivas; señala la autonomía que puedan tener las fases descri-

tas por él, es así como la Fase Hemática y el Período Pre-eruptivo pueden pasar desapercibidos y presentarse el brote verrucoso en forma inesperada. El Período Pre-eruptivo puede tener evolución crónica con brotes frustrados que se repiten por años. Weiss hace énfasis respecto de la naturaleza alérgica-hipoérgica del brote verrucoso comparándolo con los nódulos reumáticos o los del Eritema Nodoso en lo que respecta a su significado.

MATERIAL Y METODOS

De los casos. El presente trabajo se ha llevado a cabo con material correspondiente a 9 pacientes con Enfermedad de Carrión. Cuatro de ellos presentaron cuadro clínico y hematológico correspondiente a la Fase Hemática de Weiss y los 5 restantes desarrollaron brote verrucoso, por consiguiente, corresponden al período eruptivo de la Fase Histioides de Weiss.

Pacientes en Fase Hemática de Weiss. Los cuatro pacientes estuvieron internados en el Hospital Dos de Mayo de Lima; todos eran de sexo masculino. Los datos de tres de ellos están consignados en un trabajo ya publicado (7) y el cuarto caso corresponde a un paciente de 38 años de edad internado en octubre de 1968. Todos estos pacientes, a su ingreso en el hospital se quejaban de malestar general, cefaleas, trastornos gastrointestinales, artralgias y mialgias; estaban febriles, pálidos y postrados; se palpaban ganglios superficiales moderadamente aumentados de volumen, no dolorosos; en un paciente se constató bazo palpable y en el otro ictericia de piel y mucosas. Los datos de laboratorio correspondientes a sangre periférica revelaron anemia severa, parasitismo globular so-

bre el 53% con predominio de formas cooides de *B. bacilliformis* (Fig. 1), anisocitosis, poiquilocitosis, policromatofilia, reticulocitosis, presencia de normoblastos, granulaciones basófilas, anillos de Cabot y cuerpos de Howell-Jolly en escasa cantidad pero distribuidos en toda la lámina; se encontró abundantes siderositos usando la técnica de Sundberg y Brown (45). Algunos de estos datos se sintetizan en el Cuadro N° 1.

Pacientes en el Período Eruptivo de Weiss. De los cinco pacientes con brote verrucoso 3 fueron hombres y dos mujeres. Tres de los cinco estuvieron internados en el Hospital Obrero de Lima y los dos restantes en el Hospital Dos de Mayo de Lima. En el Cuadro N° 2 se hace mención a algunos de estos datos de estos pacientes.

En los 5 casos se encontró lesiones cutáneas con las características de erupción miliar y o nodular verrucosa. Las lesiones miliares eran de color rojo brillante, tensas, no dolorosas y, las lesiones nodulares estaban adheridas a la piel, algunas recubiertas por epidermis adelgazadas, de suerte que el color, era similar a las lesiones miliares. En dos pacientes, algunas lesiones estaban ulceradas y marchitas. En todos los casos se escogieron, para la biopsia, lesiones floridas no ulceradas. Las preparaciones histológicas de los verrucomas coloreados con hematoxilina-eosina mostraron el cuadro característico de proliferación angioblástica e histioide descrito clásicamente (Fig. 2). En tres de los cinco predominaba el componente angioblástico sobre el histioide y en los dos restantes, ambos componentes estaban presentes en cantidad mas o menos igual. En uno de ellos se observó fibrosis focal. En ninguna de las lesiones estudiadas se vio infiltra-

ción leucocitaria en forma ostensible ni necrosis. Todas las lesiones verrucosas estudiadas estaban cubiertas por epidermis la que, en las formas miliares, se proyectaba a manera de espolones a nivel de los márgenes, circunscribiendo la proliferación angio-histioide casi completamente. En todos los casos se investigó *B. bacilliformis* en secciones coloreadas con Giemsa usando el microscopio convencional; los resultados fueron dudosos.

Ninguno de los 9 pacientes habían recibido tratamiento con antibióticos antes de la obtención de sangre periférica y de la biopsia de verrucomas usados en el presente trabajo.

Preparación de material para microscopía electrónica. Sangre periférica de los pacientes en Fase Hemática de Weiss. Se obtuvo 10 cc. de sangre venosa, con jeringa estéril y seca, de la flexura del brazo de cada uno de los cuatro pacientes correspondientes a esta fase de la enfermedad y se preparó de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Procedimiento A: La sangre correspondiente al caso 1 y parte de la correspondiente a los casos 2 y 4 se dejó coagular. Los coágulos fueron fijados en formalina al 10% en solución isotónica salina por un tiempo mínimo de una hora. Estos coágulos fijados en formalina fueron divididos en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente, haciendo uso de una hoja nueva de afeitar. Estos fragmentos fueron post-fijados por 30 minutos a 5°C usando la solución de Millonig (solución al 1% de tetroxido de osmio en fosfato buffer ajustado a un pH 7.4) (26) los fragmentos fueron deshidratados en forma progresiva usando alcohol etílico de 70%, 80%, 95% y 100%. Terminada la deshidratación se procedió a la inclusión en Maraglas (43).

Cuadro N° 1

Pacientes	Edad años	Sexo	Duración de la enfermedad en días*	G.R. x % 10 ⁶ /mm ³	% de G.R. parasitados	B. bacilliformis cocos	bacilos
Caso 1	27	M	10	2.4	98	90%	10%
Caso 2	56	M	15	0.84	80	100%	
Caso 3	13	M	15	1.4	70	100%	
Caso 4	38	M	20	1.38	53	100%	

* En el momento del ingreso.

Cuadro N° 2

Pacientes	Edad años	Sexo	Hospital	Fecha de ingreso	Tipo de erupción	Localización
Caso 1	25	M	Obrero	30.3.66	Nodular y miliar	Extremidades
Caso 2	22	F	Dos de Mayo	21.4.66	Nodular y múltiples	Extremidades
Caso 3	26	M	Obrero	14.4.66	Nodular y miliar, múltiples	Extremidades cara y hombros
Caso 4	58	M	Dos de Mayo	18.3.67	Nodular único	Dedo pulgar de la mano
Caso 5	27	F	Obrero	20.5.69	Nodular y miliar, múltiples	Dorso de los dedos de la mano

Procedimiento B: Las muestras de sangre correspondiente al caso 3 y una parte de los casos 2 y 4 fueron desfibrinadas separándose el suero después de la centrifugación. Los glóbulos rojos así obtenidos fueron lavados por veces sucesivas con una solución salina isotónica y luego fijados con la solución de Millonig durante 30 minutos a 5°C. Se realizó post-fijación con formalina neutra al 10% por 30 minutos a 5°C. Al iniciar la deshidratación, siguiendo el mismo procedimiento que en A, se obtuvo una masa de hematíes lo suficientemente consistente como para ser dividida en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente de modo que el proceso de deshidratación e inclusión en Maraglas se llevó a cabo en forma similar al usado en el procedimiento A.

Procedimiento C: Obtención de estroma de glóbulos rojos. Las muestras restantes de los casos 2 y 4 fueron hemolizadas con cambios repetidos de agua destilada y centrifugadas hasta obtener residuo blanquecino que fue procesado de acuerdo a las técnicas de fijación, deshidratación e inclusión empleadas en el procedimiento A.

Sangre periférica control. Para el control se obtuvo sangre venosa periférica de la flexura del brazo de personas normales y de un paciente con anemia hemolítica no bartonellosica que tenía 1'200,000 hematíes por mm³ y 16% de reticulocitos. Estas muestras fueron procesadas de acuerdo a los procedimientos A, B y C.

Preparación de las lesiones verrucosas. La mitad de las biopsias correspondientes a las lesiones eruptivas escogidas de cuatro casos fueron seccionadas en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente, usando hoja nueva de afeitar, tan pronto

como se había obtenido la biopsia. Los fragmentos fueron rápidamente colocados en fijador de Millonig por una hora a 5°C y luego post-fijados en formalina neutra al 10% por 30 minutos a 5°C. La mitad restante de dichas biopsias se fijó en formalina neutra al 10% para la microscopía de luz.

La biopsia correspondiente al quinto caso fue recibida en formalina al 10% en solución acuosa no tamponada. La mitad de esta biopsia fue seccionada en fragmentos de 1 mm³ aproximadamente y post-fijados en Millonig por 1 hora a 5°C. La otra mitad se procesó para microscopía de luz. Los fragmentos correspondientes a los 5 casos fueron deshidratados en forma progresiva usando alcohol etílico de 70%, 80%, 95% y 100% e incluidos en Maraglas.

Obtención de cortes finos; empleo de técnicas para incrementar contraste de imágenes y observación con el microscopio electrónico. El material correspondiente a sangre periférica y lesiones eruptivas incluido en maraglas fue seccionado en laminillas seriadas o semiseriadas, obteniéndose cintas de 50 a 1000 Å de espesor. La obtención de estas cintas se logró usando ultramicrotomos Porter-Blume MT1 y MT2 con cuchillas de vidrio.

Las cintas de tejidos fueron recogidas sobre rejillas metálicas de cobre de malla 200 con membranas de parlodion y de malla 300 sin membrana. Las preparaciones fueron impregnadas con soluciones de hidróxido de plomo (27) y de acetato de uranil y examinadas con un microscopio electrónico Philips EM 200 previa estabilización de la corriente de lentes y corrección de astigmatismo, acelerando el rayo electrónico con corriente de 60 KV.

Por lo menos se examinó 20 secciones seriadas de cada caso, fotografiando campos diferentes de las preparaciones. Para la fotografía se usó placas de grano fino y alto contraste de 3.1 4 x 4 pulgadas las que fueron desarrolladas con revelador D19 y fijadas rápidamente. Las copias se obtuvieron por ampliación usando papel bromuro.

RESULTADOS

Características ultraestructurales y dimensiones de la B. bacilliformis en el hematíe. Recientemente, en un trabajo orientado a demostrar la localización endoglobular de la *B. bacilliformis*, hemos señalado algunas características ultraestructurales del germen de la enfermedad de Carrión (7). En el presente trabajo, ampliando nuestras observaciones, hemos encontrado *B. bacilliformis* cocoides, ovoides, cocobacilares (algunas en forma de palanquetas) y bacilares, predominando las formas ovoides. Las mediciones de estas formas han sido sometidas a cálculos y análisis estadísticos (Cuadro Nº 3). Como se puede apreciar en este cuadro, las diferencias de tamaño de cada una de las formas son estadísticamente significativas. Ellas tenían características ultraestructurales de bacterias (13, 41); estaban constituidas por una pared bacteriana de 200 Å de espesor promedio, pared que, en algunos casos, mostró hasta 3 hojas; una intermedia y dos extremas de mayor densidad electrónica que la intermedia. Algunos organismos, en cualquiera de sus formas, mostraron, además, microcápsulas de aproximadamente 50 Å de espesor. El citoplasma estaba constituido por gránulos osmofílicos de algo más de 100 Å de diámetro

y membrana citoplasmática algo más gruesa que la microcápsula. En algunos casos, entre la pared bacteriana y la membrana citoplasmática, se apreció un espacio de mucho menor densidad electrónica que los elementos mencionados. En ninguna de las preparaciones fue posible apreciar flagelos unipolares o de otra localización. En contraste con el aspecto granular del citoplasma se apreció zonas irregulares de naturaleza fibrilar, de menor densidad electrónica que el citoplasma, variables en extensión, número y localización y carentes de membranas limitantes (Figs. 3, 4 y 5).

Características ultraestructurales de la B. bacilliformis en el verrucoma. Al igual que los hematíes aquí se observó formas cocoides, ovoides, cocobacilares y bacilares con predominio de las formas ovoides; sin embargo, se encontró formas bacilares en mayor número que en los hematíes. Las mediciones obtenidas en las diversas formas también han sido sometidas a cálculos y análisis estadísticos que son presentados en el Cuadro Nº 4. Estos resultados también indican variabilidad en el tamaño de los individuos de una misma forma con significado estadístico.

La ultraestructura de las diversas formas de *Bartonella bacilliformis* encontradas en los verrucomas fue semejante a la descrita para los microorganismos de los hematíes. Sin embargo, la pared bacteriana era mucho más delgada, correspondiendo más o menos a unos 100 Å de espesor; además, algunas formas cocoides mostraron citoplasma con gránulos muy gruesos y ausencia de zonas fibrilares de menor densidad electrónica (Fig. 8).

Relación de tamaño entre B. bacilliformis del hematíes y B. bacilliformis del

Cuadro N° 3. Mediciones de la "B. bacilliformis" en milimicras.. Fase Hemática de la Enfermedad de Carrión

N°	Formas	Dimensiones	Media ± E.S.	Desviación Standard ± E.S.	Coefficiente de Variabilidad %	Valores Extremos
138		Mayor	603.33 ± 33.86	139.50 ± 23.93	23.12	310 — 770
		Menor	405.00 ± 28.46	117.24 ± 20.11	28.94	220 — 590
78	Cocobacilos	Mayor	977.16 ± 20.39	67.90 ± 14.50	6.95	860 — 1,120
		Menor	451.88 ± 14.82	49.37 ± 10.55	10.93	340 — 530
63	Bacilos	Mayor	1,494.50 ± 33.30	87.93 ± 23.51	5.88	1,380 — 1,630
		Menor	313.75 ± 31.30	82.75 ± 22.45	26.37	190 — 420

Cuadro N° 4. Mediciones de la "B. bacilliformis" en milimicras. Fase Histoide de la Enfermedad de Carrion

N°	Formas	Dimensiones	Media ± E.S.	Desviación Standard ± E.S.	Coefficiente de Variabilidad %	Valores Extremos
128	Ovalados	Mayor	335.79 ± 11.21	68.27 ± 7.93	20.38	220 — 590
		Menor	196.84 ± 7.29	44.38 ± 5.16	22.55	120 — 300
100	Cocobacilos	Mayor	645.00 ± 60.02	180.07 ± 42.47	27.92	490 — 840
		Menor	282.00 ± 20.43	61.28 ± 14.44	21.74	190 — 380
70	Bacilos	Mayor	1,089.23 ± 77.39	267.77 ± 54.76	24.58	760 — 1,620
		Menor	203.84 ± 15.03	51.99 ± 10.63	25.50	120 — 320

verrucoma. Si comparamos las mediciones de las diversas formas de *B. bacilliformis* del hematíe con sus similares del *verrucoma* encontramos valores cuya diferencia estadística es altamente significativa, como se aprecia en el Cuadro N° 5. La diferencia de la media del diámetro mayor de las formas ovoides es de 267.54 milimicrones con un error standard de \pm 35.69 y el cálculo de probabilidades es menor a 0.001; igualmente, el diámetro menor de esta forma como las dimensiones de las formas cocobacilares y las bacilares indican diferencias de medias obviamente significativas a favor de las formas encontradas en los hematíes.

Multiplicación de la B. bacilliformis en el hematíe y en el verrucoma. Algunos de los gérmenes cocobacilares y bacilares encontrados en los cortes finos de glóbulos rojos y *verrucomas*, mostraron unas veces tabique único y otras múltiple, de dirección transversal, constituido por la pared bacteriana y la microcápsula cuando esta última existía. En ocasiones, los segmentos resultantes del tabicamiento transversal se encontraban algo separados, dando la configuración de un rosario o cadeneta de micro-organismos. Sólo en una oportunidad se encontró estrangulamiento asimétrico de una forma cocobacilar sin la formación de tabique transversal (Figs. 6, 9, 10 y 11).

Características ultraestructurales de los hematíes. Las secciones finas de glóbulos rojos no parasitados y del control se observaron, con el microscopio electrónico, como laminillas ovoides, redondeadas, en forma de raquetas o de contornos irregulares de gran densidad electrónica debido a la reducción del tetróxido de osmio por la hemoglobina. Estas laminillas estaban limitadas por membrana

que persistía después de la hemólisis con características similares a las descritas en membranas de otras células, es decir, tenían un grosor de aproximadamente 80 Å y estaban constituidas por 3 hojas, una media de densidad inferior a las dos extremas. En ocasiones, adherido a la membrana, se constató gránulos de densidad electrónica mayor que la del hematíe, de diámetro variable entre 300 y 1500 Å aproximadamente (Figs. 5 y 9). Frecuentemente se observó laminillas con vacuolas vacías u ocupadas sólo con gránulos de ferritina o con restos de organelas y/o con cuerpos densos; en ocasiones, con membrana limitante (Figs. 12, 13 y 14). Las secciones finas de glóbulos rojos hemolizados (estroma) se caracterizaban por la presencia de membranas globulares que delimitaban espacios irregulares; estas membranas estaban casi adosadas entre si y sólo en ocasiones separadas por espacios triangulares. Algunos hematíes resistieron parcialmente el proceso de hemólisis, de suerte que, conservaban sus características de laminillas densas con la particularidad de mostrar numerosas estructuras vacuoladas, sobre todo en la periferia (Figs. 15 y 16).

Complejo Bartonella-hematíe.

Localización de la B. bacilliformis. En las laminillas de glóbulos rojos parasitados se observó una o más estructuras bacterianas, predominantemente formas ovoides, localizadas de preferencia en zonas periféricas de las laminillas en estrecha relación con la matriz densa del hematíe y separadas de ésta por una fina membrana. En ocasiones se encontró hasta dos microorganismos libres en una cavidad mas o menos amplia que tenía las características de una vesícula. En

Cuadro Nº 5. Relación de tamaño entre "B. bacilliformis" de la Fase Hemática y la Fase Histioides. Diferencia de los valores medios y cálculo de probabilidades

Dimensiones	OVOIDES		COCOBACILOS		BACILOS	
	Mayor	Menor	Mayor	Menor	Mayor	Menor
Media \pm E.S. en la Fase Hemática	603.33 \pm 33.86	405.00 \pm 28.46	977.16 \pm 20.39	451.88 \pm 14.82	1,494.50 \pm 33.30	313.75 \pm 31.30
Media \pm E.S. en la Fase Histioides	335.79 \pm 11.21	196.84 \pm 7.29	645.00 \pm 60.02	282.00 \pm 20.43	1,089.23 \pm 77.39	203.84 \pm 15.03
Diferencia de las Medias \pm E.S.	267.54 \pm 35.69	208.16 \pm 29.37	332.16 \pm 63.38	169.88 \pm 25.23	405.27 \pm 84.22	109.91 \pm 34.72
Probabilidades	P < 0.001	P < 0.0001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.01

estas vesículas, a veces se observó la presencia de gránulos adheridos a los microorganismos o adheridos a la superficie interna de la cavidad; estos gránulos tenían el tamaño y las características de aquellos descritos en relación con la membrana de las laminillas de hematíes (Figs. 17, 18 y 19).

En las preparaciones de hematíes hemolizados se observó formas ovoides, cocobacilares y bacilares de *B. bacilliformis* adheridos a la superficie interna de la membrana globular (Fig. 20) o suspendidas en resto de matriz globular.

Penetración de la B. bacilliformis en el glóbulo rojo. Algunas laminillas de hematíes no hemolizados mostraron prolongaciones citoplasmáticas de aproximadamente 1000 \AA de grosor y de algunas micras de longitud. Estas prolongaciones se encontraban atrapando bartonellas las que hacían muesca en la superficie de la laminilla del hematíe. En otras ocasiones se observó el extremo libre de las prolongaciones citoplasmáticas señaladas adherido a la membrana del hematíe, de modo que los microorganismos quedaban encerrados e incluidos en la matriz citoplasmática del hematíe (Fig. 21, 22).

Características ultraestructurales del verrucoma. El estudio de los cortes finos del material correspondiente a botones verrucosos observados con el microscopio electrónico reveló los siguientes tipos celulares:

Tipo A. Células generalmente ovoides con núcleo voluminoso y mellado y, citoplasma escaso. Escasa cantidad de mitocondrias y de retículo-endoplasma granular y de ribosomas; complejo de Golgi poco desarrollado. El núcleo era de cromatina fina y uniformemente dis-

tribuido; nucleolo generalmente prominente. Estas células estaban libres o parcialmente unidas a otras semejantes por desmosomas y medían aproximadamente entre 15 y 20 micras de diámetro mayor (Fig. 23).

Tipo B. Este tipo de célula era algo más grande y con citoplasma más abundante que el tipo A; tenían un mayor número de mitocondrias, mayor cantidad de retículo-endoplasma granular y ribosomas y un Golgi más desarrollado que la célula precedente. El núcleo también, a veces, mostraba melladura, era de cromatina uniformemente distribuida; se observó en ocasiones un nucleolo. Estas células estaban rodeadas completa o incompletamente por una lámina fina de material electrónicamente denso (Fig. 23).

Tipo C. Este tipo de célula era alargada, de características nucleares y citoplasmáticas similares a la célula tipo B aunque las organelas eran mucho más numerosas que las vistas en este tipo celular apreciándose, además, gran actividad micropinocitótica. Estas células fueron vistas aisladamente y delimitando espacios al unirse por desmosomas con otras similares; los espacios delimitados por estas células estaban libres u ocupadas por hematíes. Estas células, al igual que las de tipo B descansaban sobre una membrana fina electrónicamente densa (Figs. 24, 27).

Tipo D. Este tipo de célula era la más voluminosa de las observadas en el verrucoma, aproximadamente dos o tres veces más grande que la célula de tipo A. Se caracterizaba por ser de forma irregular, unas veces de contornos circulares y con algunas prolongaciones tipo micro-

vellos. El citoplasma de estas células era rico en mitocondrias, tenía regular cantidad de retículo-endoplasma granular, escasos ribosomas libres, escasos cuerpos densos y figuras mielínicas delimitados por membrana; complejo de Golgi bien desarrollado y numerosos perfiles cisternales limitados por membranas lisas en toda la extensión citoplasmática. El núcleo era pequeño, de cromatina gruesa, con nucleolo generalmente único, a veces rechazado hacia la periferia de la célula. (Figs. 25, 27).

Tipo E. Este tipo celular era de citoplasma y núcleo alargado. El citoplasma mostró numerosos perfiles de retículo endoplasma granular y tenía un complejo de Golgi bien desarrollado. El núcleo era de cromatina gruesa, desigualmente distribuida y nucleolo generalmente único y pequeño (Fig. 26).

Las células tipo A, B, C y D estaban separadas por material aparentemente amorfo de poca densidad electrónica. En zonas, donde se encontraban células tipo E, había numerosas fibrillas aisladas y agrupadas en paquetes de diverso grosor; estas fibrillas tenían periodicidad de apro-

ximadamente 640 Å (Fig. 26). Entre las células descritas también se encontró vacuolas libres y fragmentos celulares (Fig. 27).

Complejo Bartonella-Verrucoma.

Como ya mencionamos anteriormente, en los verrucomas se observó diversas formas de *B. bacilliformis*, aunque predominaban las formas ovoides. Estos microorganismos fueron vistos aisladamente y en grupos en el intersticio y en las células tipo B, C y D. En el intersticio se encontró grupos muy numerosos; en las células tipo D, el número de *B. bacilliformis* era ostensiblemente mayor que en las células tipo B y C. En las células tipo A y tipo E, no se encontró Bartonella. En algunos preparados se apreció prolongaciones citoplasmáticas de las células tipo B, C y D, a manera de pseudópodos, prolongaciones que englobaban uno o más microorganismos conjuntamente con la sustancia intersticial. En las células tipo D, los microorganismos fueron vistos en la luz de cisternas limitadas por membranas lisas (Figs. 6, 7, 24, 25, 28, 29 y 30).

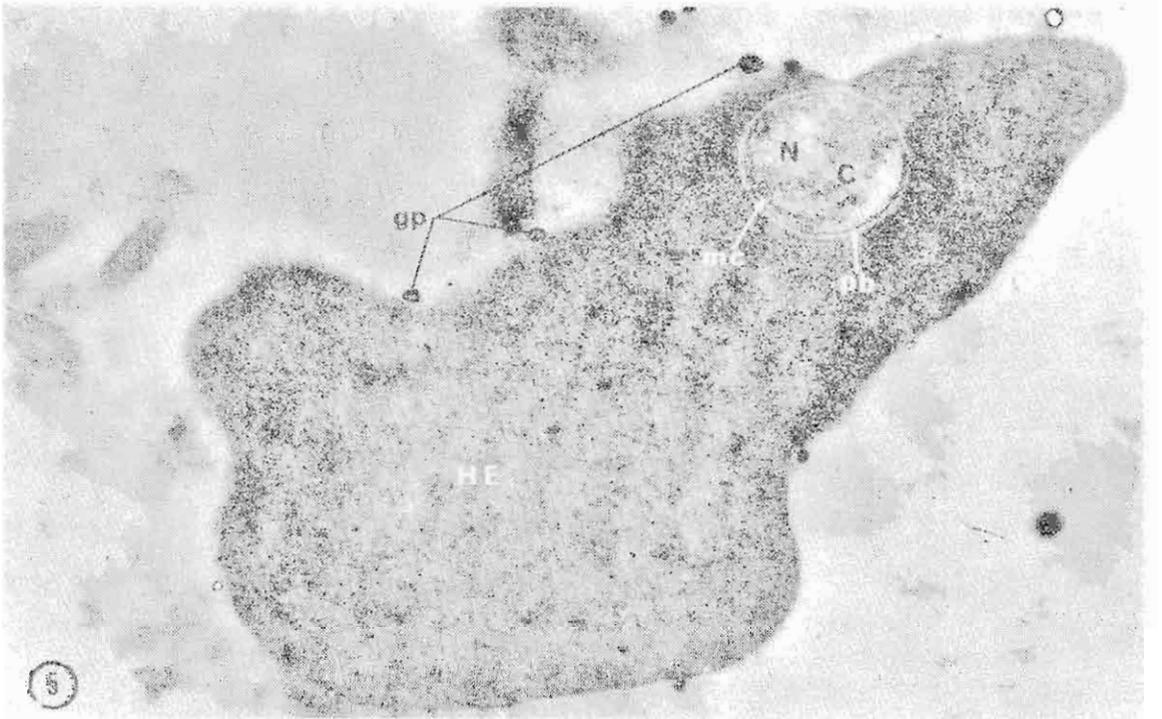
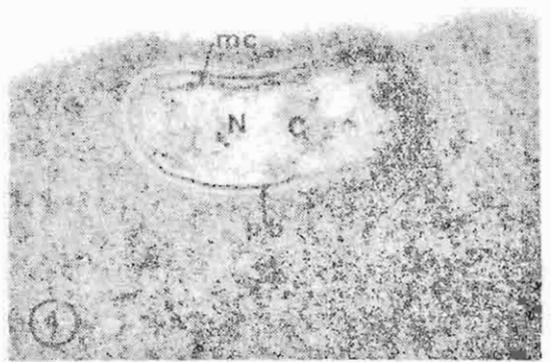
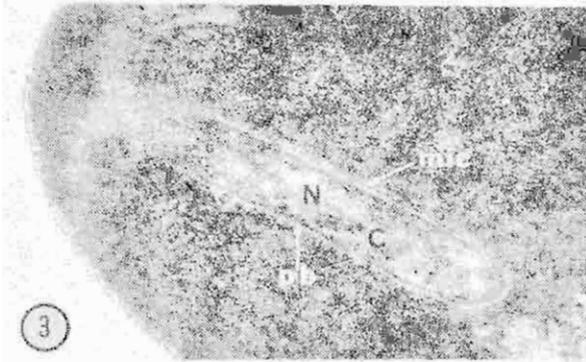
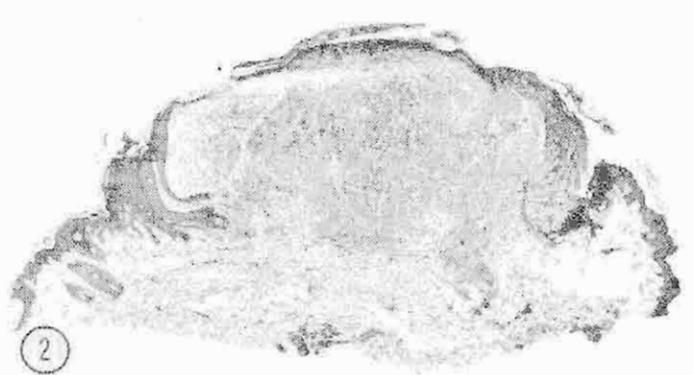
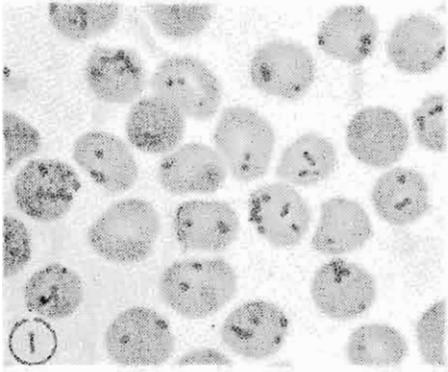
ABREVIACIONES USADAS EN LAS FIGURAS

Bb	=	Bartonella bacilliformis
HE	=	Hematíe
N	=	Núcleo
n	=	Nucleolo
C	=	Citoplasma
mc	=	Membrana celular
pb	=	Pared bacteriana
mic	=	Microcápsula
gp	=	Gránulos periféricos
tt	=	Tabique transversal
cd	=	Cuerpo denso
va	=	Vacuola autofágica
gf	=	Gránulos de ferritina
dm	=	Doble membrana
ei	=	Espacio intersticial
mh	=	Membrana del hematíe
pch	=	Prolongación citoplasmática del hematíe
reg	=	Reticulo endoplasma granular
m	=	Mitocondria
pc	=	Prolongación citoplasmática
mb	=	Membrana basal
Go	=	Complejo de Golgi
CeA	=	Célula tipo A
CeB	=	Célula tipo B
CeC	=	Célula tipo C
CeD	=	Célula tipo D
CeE	=	Célula tipo E
d	=	Desmosoma
LU	=	Lumen
li	=	Lisosoma
v	=	Cisternas de perfiles lisos
Co	=	Colágeno
VRc	=	Vacuolas y restos celulares
SF	=	Sustancia fundamental

L A M I N A I

- Fig. 1. Extendido de sangre periférica. Glóbulos rojos parasitados por formas cocoides de **Bartonella bacilliformis**. Coloración de Wright. X 1,048.
- Fig. 2. Microfotografía de lesión miliar verrucosa cubierta en su superficie libre por epidermis. Los bordes laterales de la epidermis se insinúan a manera de espaldones tratando de circunscribir la lesión. H. E. X 23.
- Fig. 3. Ultraestructura de la forma bacilar de **B. bacilliformis** en el hematíe. Se aprecia núcleo, citoplasma, pared bacteriana y microcápsula. X 34,410.
- Fig. 4. Ultraestructura de la forma cocobacilar de **B. bacilliformis** en el hematíe. Nótese la membrana citoplasmática. X 31,915.
- Fig. 5. Ultraestructura de un hematíe. **B. bacilliformis** en el seno del hematíe y gránulos osmofílicos periféricos. X 23,438.

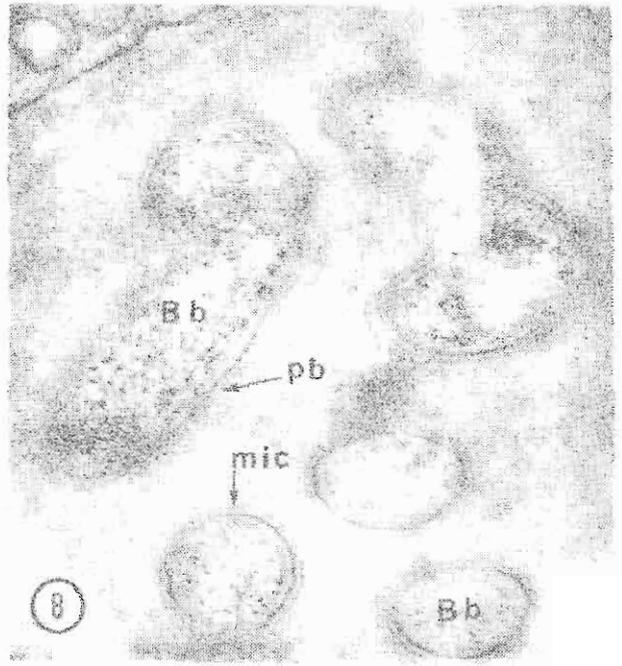
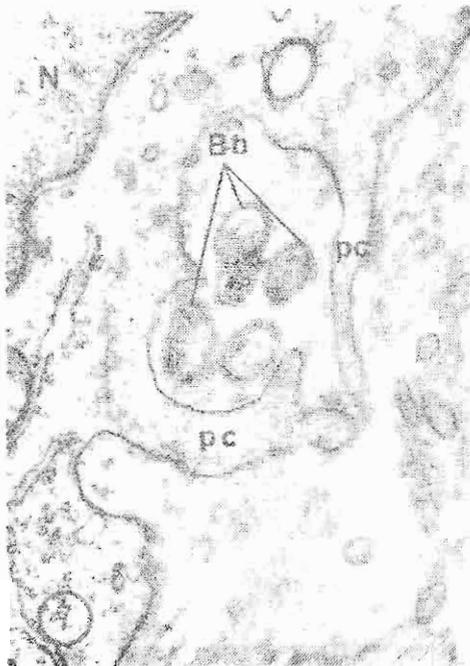
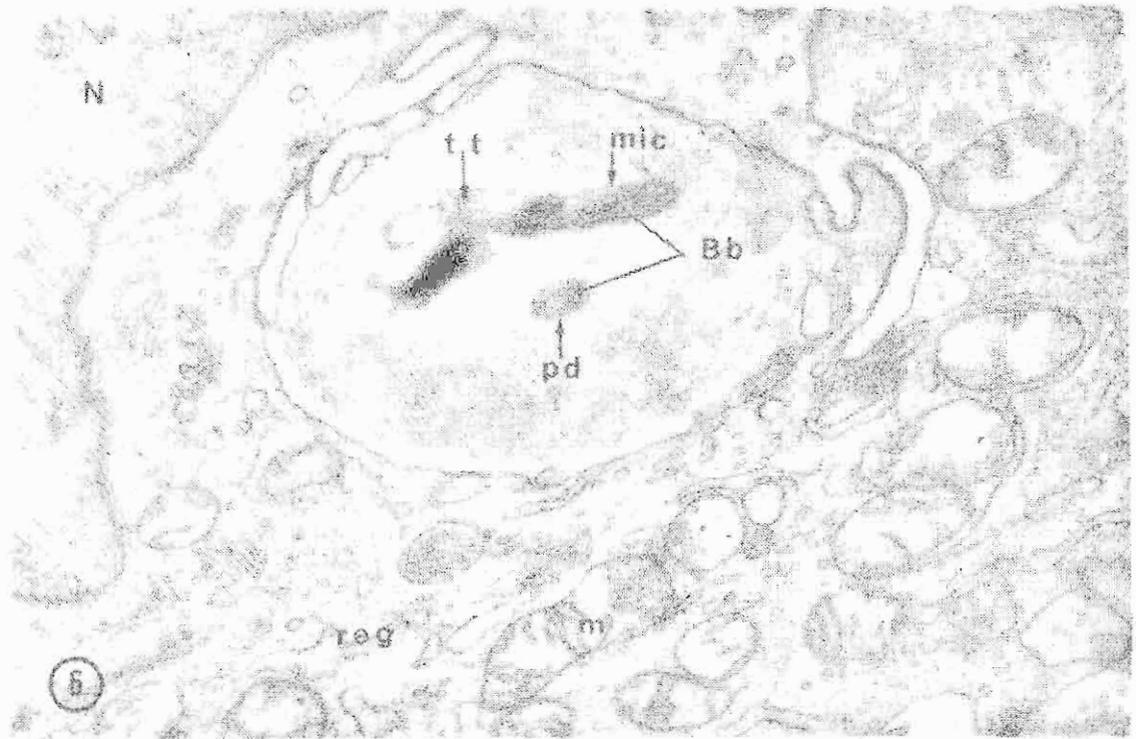
LAMINA I



L A M I N A II

- Fig. 6. Ultraestructura de una parte de célula tipo D del Verrucoma. En cisterna citoplasmática se observa formas bacilares, cocobacilares y ovoides de **Bartonella bacilliformis** reconociéndose pared bacteriana y microcápsula. Nótese tabique transverso entre dos estructuras bacterianas. X 21,225.
- Fig. 7. Ultraestructura de una parte de célula tipo D. Se observa prolongaciones citoplasmáticas a manera de pseudópodos las que tienden a unirse por sus extremos libres englobando formas ovoides de **B. bacilliformis**. X 25,875.
- Fig. 8. Formas cocobacilares y ovoides de **B. bacilliformis** con cambios ultraestructurales citoplasmáticos indicativos de degeneración. En el extremo superior izquierdo se advierte membrana de la célula huésped. X 51,240.

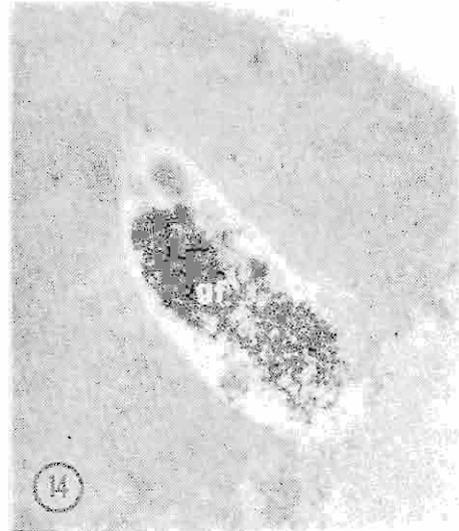
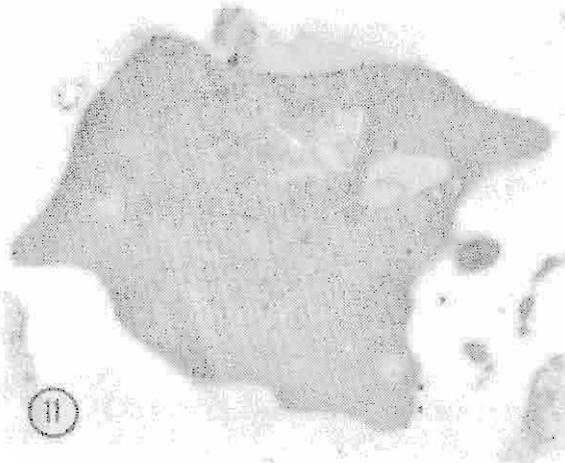
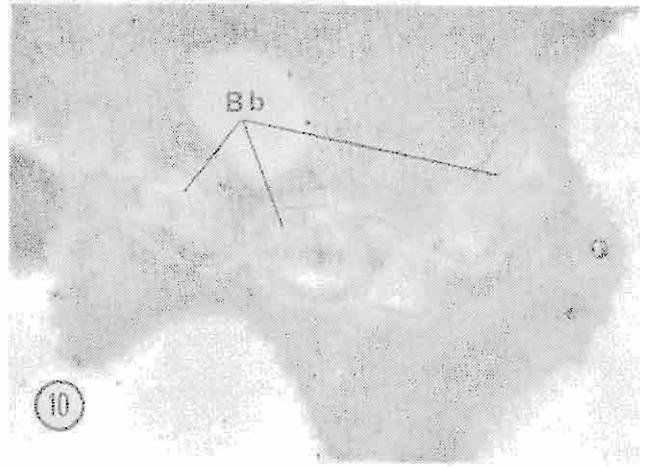
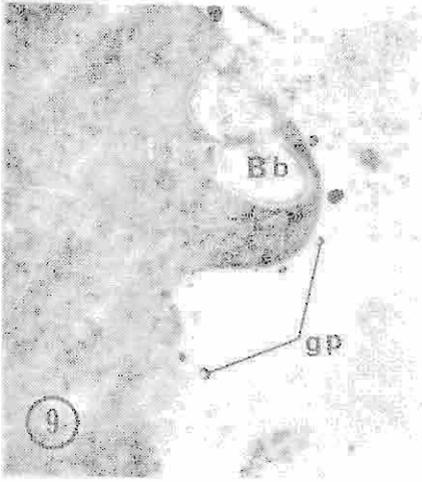
LAMINA II



L A M I N A III

- Fig. 9. **B. bacilliformis** dividiéndose por tabicamiento. (La flecha indica el tabique transversal). Gránulos osmofílicos adheridos al glóbulo rojo. X 16,850.
- Fig. 10. Tres formas cocobacilares de **B. bacilliformis** en cadena separadas por espacios muy estrechos. Esta fotografía es indicativa de división del germen por tabicamiento, de formas bacilares en cocobacilares, dentro del glóbulo rojo. X 23,438.
- Fig. 11. Hematíe conteniendo **B. bacilliformis**. Uno de los gérmenes muestra estrangulación asimétrica (flecha). X 10,478.
- Fig. 12. Parte de un hematíe que contiene formación ovoide de alta densidad electrónica cerca a la periferia (cuerpo denso). X 14,813.
- Fig. 13. Laminilla (sección) de hematíe que muestra vacuolas ocupadas por diversas estructuras (restos de organelos). X 11,850.
- Fig. 14. Parte de una laminilla correspondiente a un hematíe que muestra vacuola conteniendo gránulos de ferritina. X 35,813.

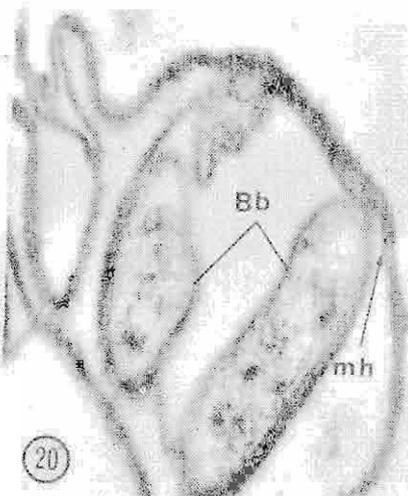
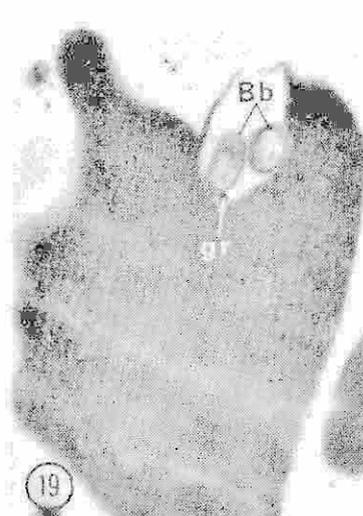
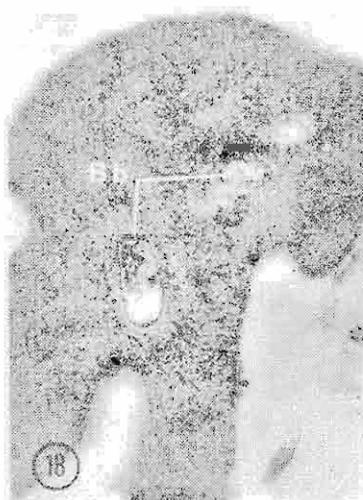
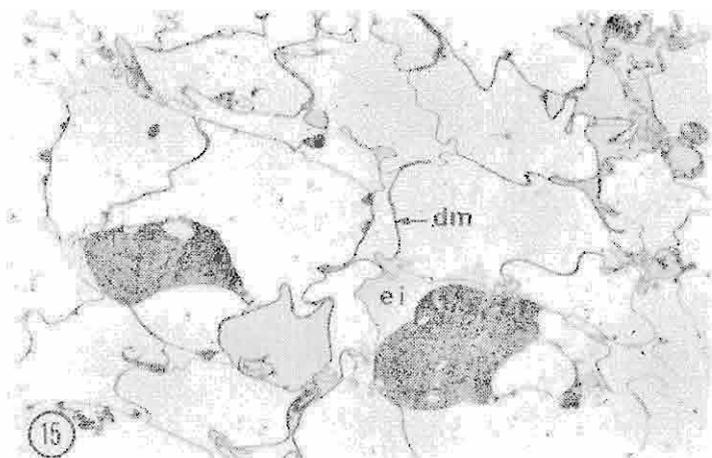
LAMINA III



LAMINA IV

- Fig. 15. Sección ultrafina de glóbulos rojos hemolizados (estroma). Se observa membranas que delimitan espacios irregulares, algunos parcial o totalmente ocupados por material de mediana densidad electrónica (hematíes que han resistido el proceso de hemólisis). La flecha indica membranas adosadas que en su extremo inferior se separan quedando un espacio libre entre los hematíes total o parcialmente hemolizados. X 4,050.
- Fig. 16. Sección ultrafina de glóbulos rojos parcialmente hemolizados. Obsérvase numerosas vacuolas periféricas. X 11,138.
- Fig. 17. Sección ultrafina de un hematíe (laminilla) en cuyo seno, localizadas en zona marginal, se observan tres formas ovoides de *B. bacilliformis* las que están separadas de la matriz del hematíe por fina membrana. X 9,375.
- Fig. 18. Sección ultrafina de un hematíe en cuyo seno, localizado aparentemente en zona central, se observa dos formas ovaladas de *B. bacilliformis*. X 9,375.
- Fig. 19. Sección ultrafina de un hematíe que muestra vesícula conteniendo dos estructuras ovoides con características de *B. bacilliformis*. Adherido a una de las estructuras bacterianas se vé gránulo osmofílico (flecha). X 10,478.
- Fig. 20. Sección ultrafina de hematíes hemolizados. Obsérvase dos estructuras bacterianas correspondientes a *B. bacilliformis* adheridas a la superficie interna de la membrana del hematíe. X 18,750.
- Fig. 21. Sección ultrafina de un hematíe que en el polo superior muestra depresión sobre la cual se observa estructura ovoide correspondiente a *B. bacilliformis*. Nótese que en la vecindad hay estructuras alargadas, una de ellas envolviendo completamente la superficie libre de la bartonella. X 9,375.
- Fig. 22. Parte de una laminilla de glóbulo rojo en el que se observa dos formas cocobacilares de *B. bacilliformis* atrapadas por prolongación citoplasmática. Nótese que uno de los gérmenes aún no ha sido cubierto totalmente por la prolongación. X 23,888.

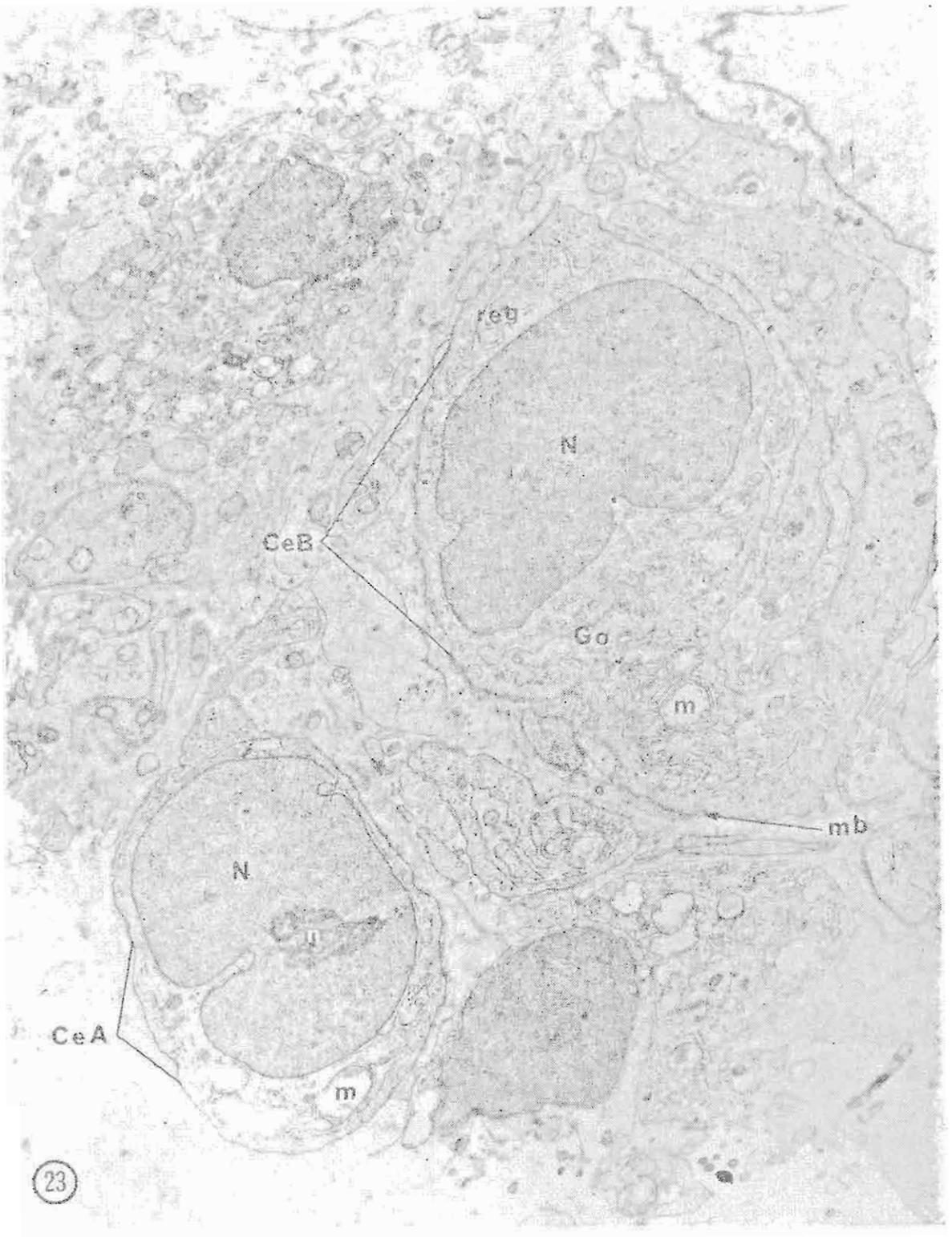
LAMINA IV



LAMINA V

Fig. 23. Ultraestructura de las células tipo A y B observadas en el verrucoma. La célula tipo A (CeA) muestra núcleo voluminoso, nucleolo prominente y, escasa cantidad de organelas. La célula tipo B tiene citoplasma amplio con mayor número de organelas que el de tipo A y está rodeada por membrana basal. X 8,438.

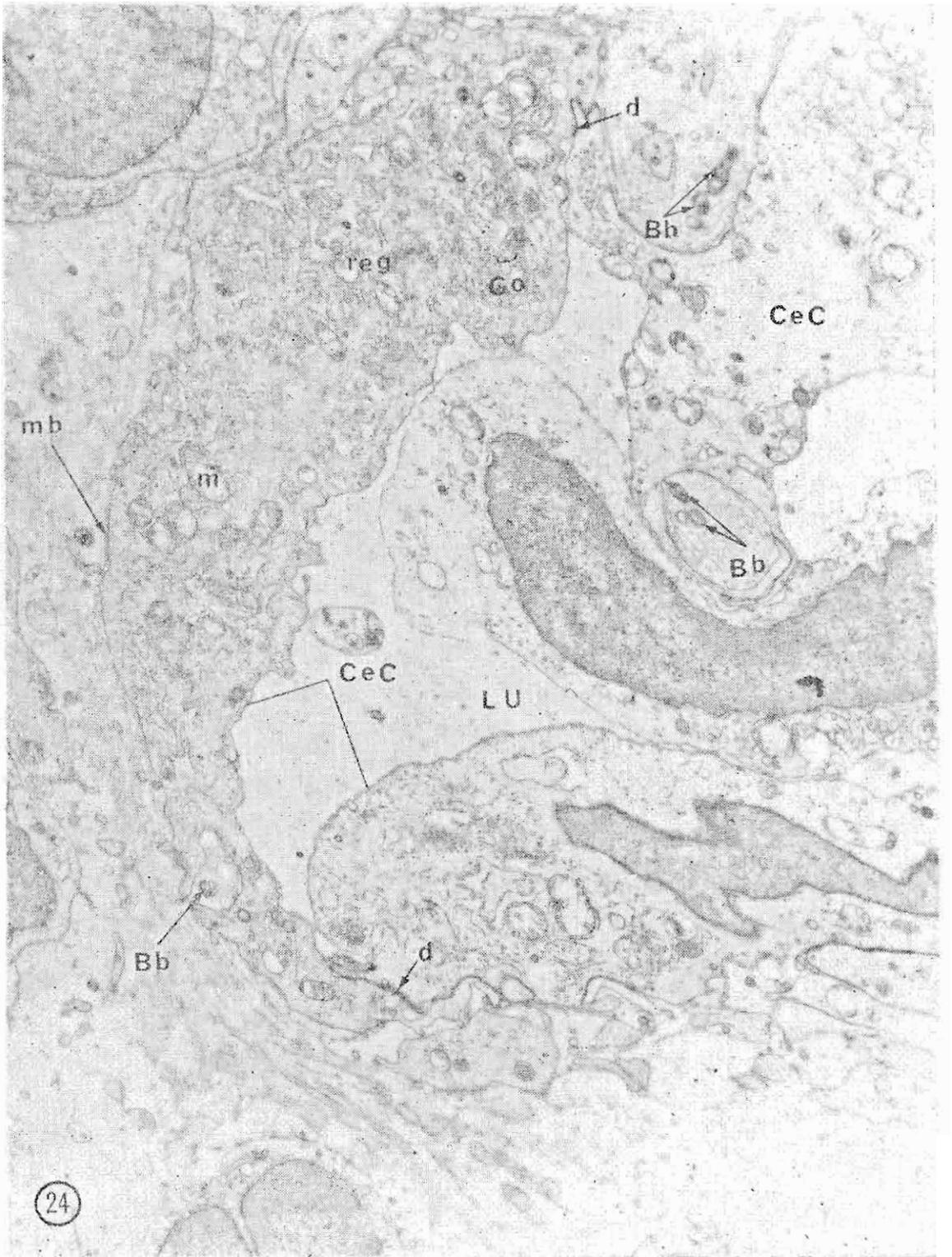
LAMINA V



L A M I N A VI

- Fig. 24. Ultraestructura de la célula tipo C del verrucoma (CeC). Estas son alargadas, con numerosas organelas citoplasmáticas y unidas entre sí por desmosomas, delimitando un espacio irregular. En el citoplasma de las mismas se aprecia numerosas vesículas pequeñas (vesículas de micropinocitosis). Estas células descansan sobre membrana basal. Nótese que en el intersticio celular (extremo inferior derecho), así como también en cisterna citoplasmática de una de ellas y, englobadas por prolongaciones citoplasmáticas en otras, hay formas ovoides de **B. bacilliformis**. X 8,438.

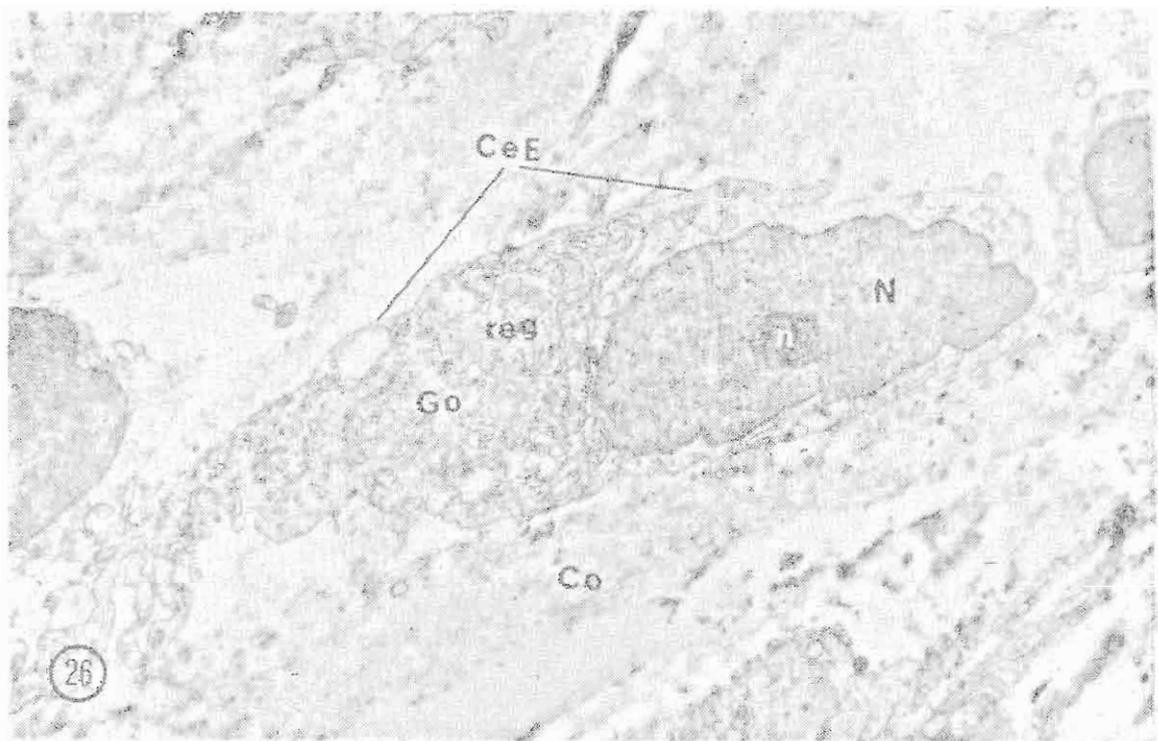
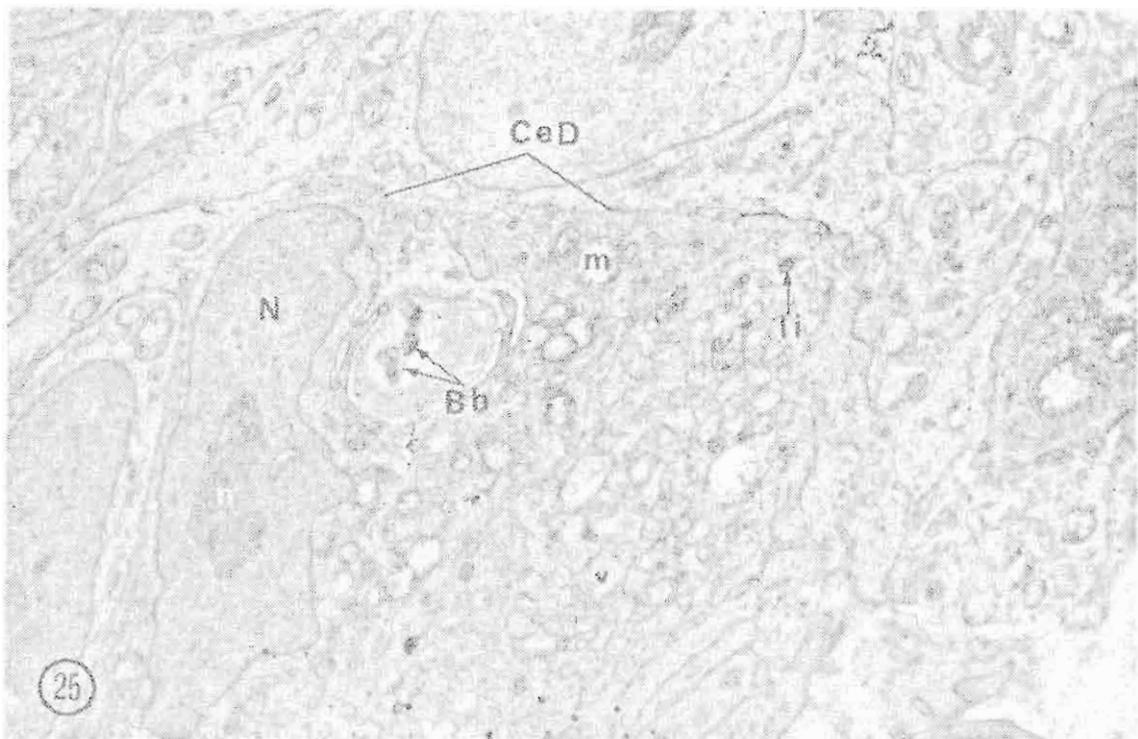
LAMINA VI



L A M I N A VII

- Fig. 25. Ultraestructura de la célula tipo D (CeD) del verrucoma. Nótese el gran volumen de la célula, sus contornos irregulares, núcleo excéntrico, citoplasma con numerosas organelas y cisternas de perfiles lisos, escasos lisosomas y vesícula conteniendo **Bartonella bacilliformis** con sustancia fundamental. X 4,875.
- Fig. 26. Ultraestructura de la célula tipo E (CeE). Las características de esta célula corresponden a la del fibroblasto. En la vecindad de esta célula se observa fibrillas seccionadas en forma transversal y longitudinal las que corresponden a colágeno. X 6,000.

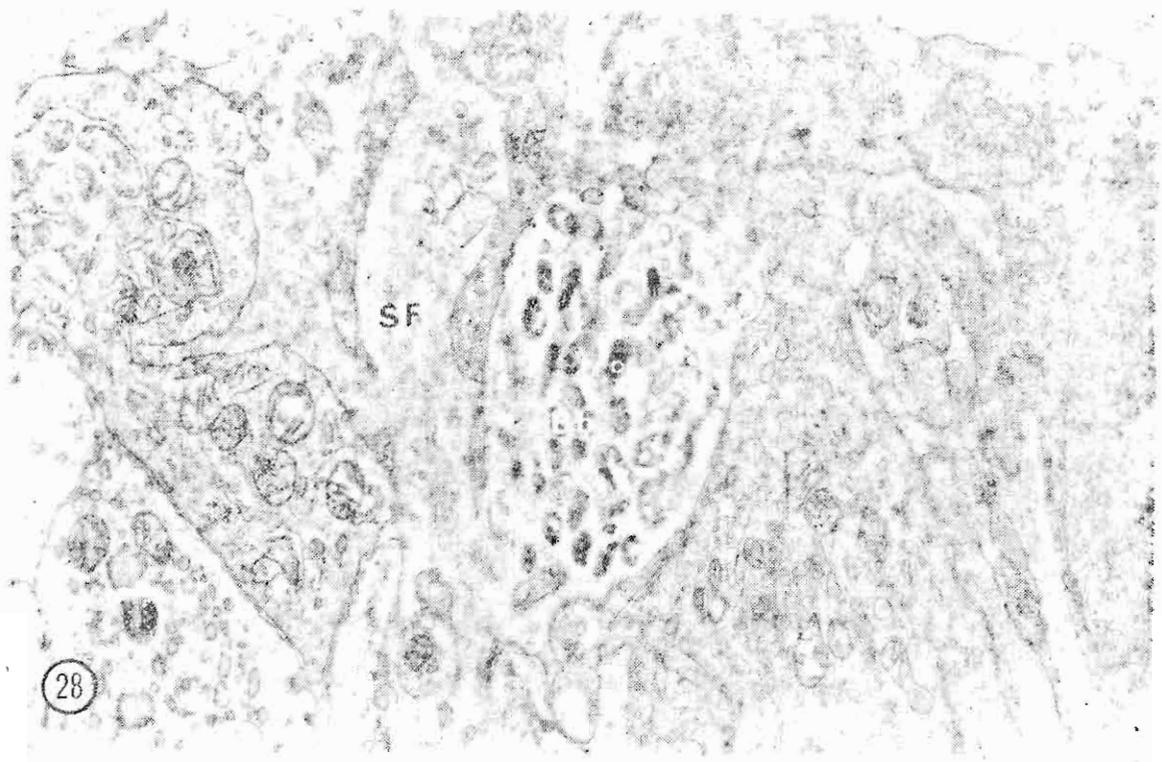
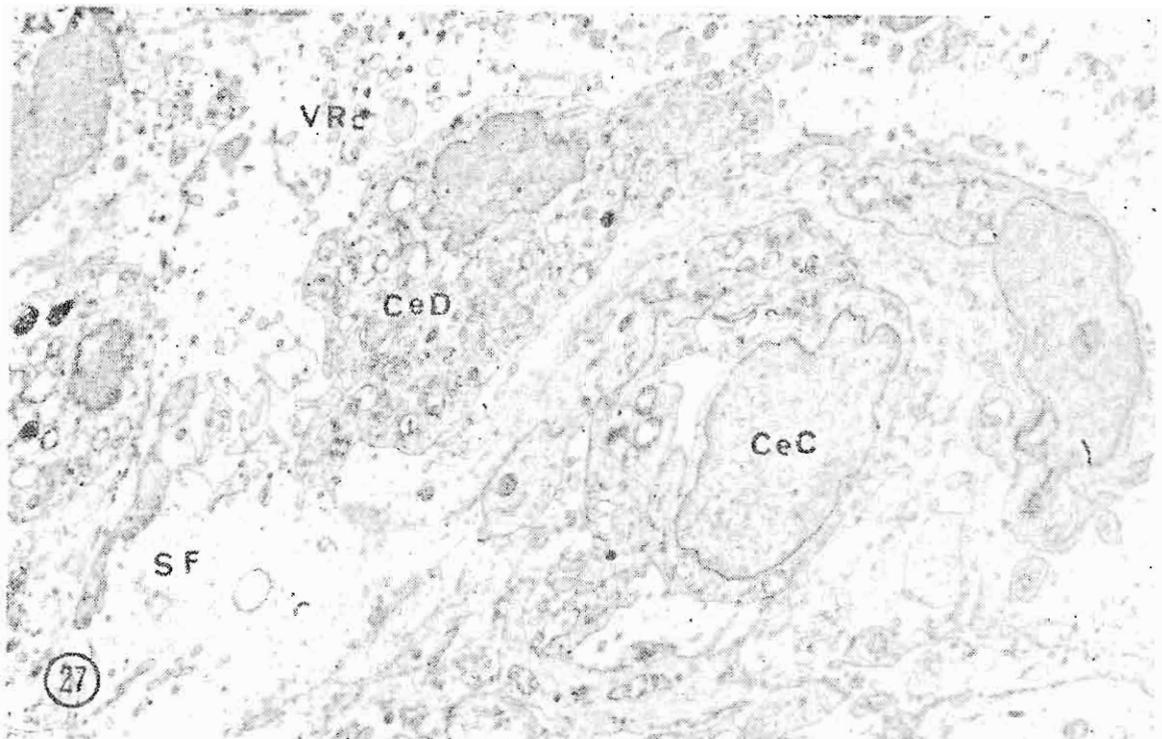
LAMINA VII



L A M I N A VIII

- Fig. 27. Ultraestructura de células tipo C y D. Nótese que una sola célula tipo C (célula endotelial) forma la luz de un capilar. Entre las células se aprecia "sustancia fundamental" de aspecto amorfo y débil densidad electrónica, así como también vacuolas y restos celulares. X 3,300.
- Fig. 28. Fotografía que muestra colonia de **Bartonella bacilliformis**, predominantemente de forma oval, localizadas en la "sustancia fundamental" (intersticio celular) del verrucoma. X 12,375.

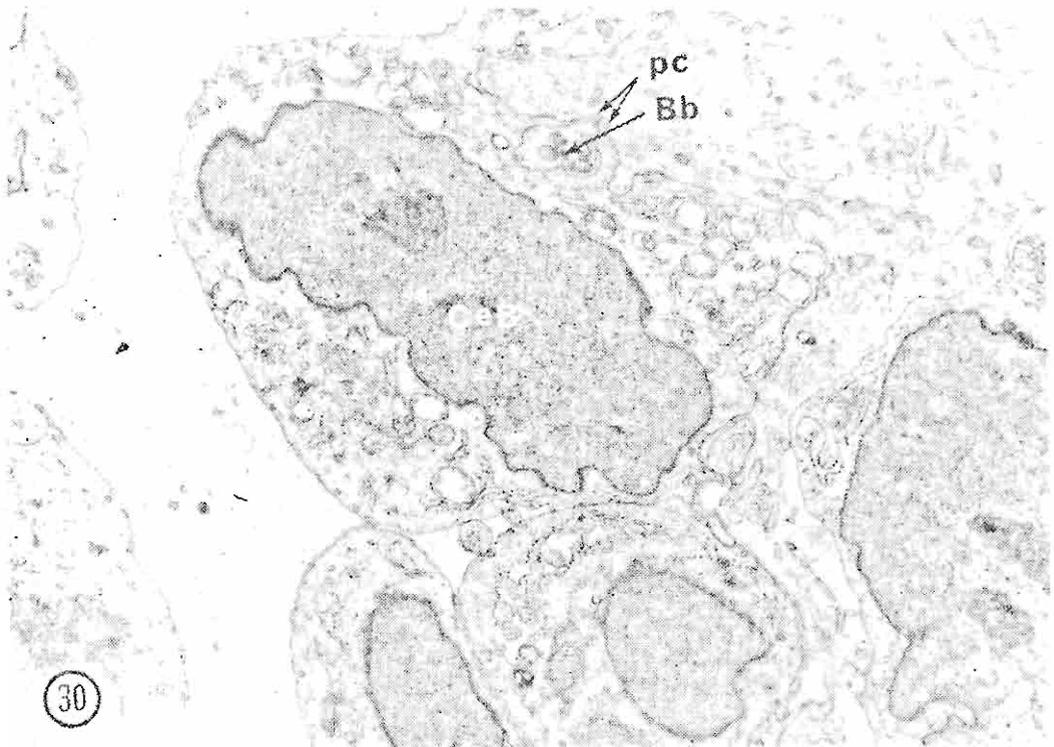
LAMINA VIII



L A M I N A IX

- Fig. 29. Parte del citoplasma de una célula tipo D. Se aprecia, en el interior de un espacio cisternal limitado por membrana, dos formas ovoides de **B. bacilliformis** y material amorfo con las características descritas para la "sustancia fundamental". X 4,500.
- Fig. 30. Célula tipo "B" con prolongaciones citoplasmáticas a manera de pseudópodos los que engloban varias formas ovaes de **B. bacilliformis**. (Obsérvese también la Fig. 7). X 6,300.

LAMINA IX



DISCUSION

La variabilidad de tamaño de las diversas formas descritas de *B. bacilliformis* en la Fase Hemática de la enfermedad se explica considerando que estos microorganismos, como cualquier otra bacteria, están sujetos a variaciones individuales dependientes del genotipo y probablemente de factores ambientales. La variabilidad en el tamaño de los gérmenes de una población bacteriana puede evaluarse con el microscopio convencional. Sin embargo, en el caso de la *B. bacilliformis*, debido a las dimensiones reducidas, en oportunidades casi en el límite de la capacidad resolutive de este instrumento óptico, esta apreciación resulta difícil; en cambio, con el microscopio electrónico, pueden hacerse apreciaciones dimensionales del orden de la milimicra. Así, Valentini (48) usando el microscopio electrónico ha llevado a cabo mediciones en poblaciones de *Microbacterium lepro-murium*.

Las características ultraestructurales de las diversas formas de *B. bacilliformis* encontradas en el hematíe son idénticas. En otras palabras, no hay diferencias ultraestructurales entre las formas cocoides, ovoides, cocobacilares y bacilares. Esta observación no concuerda con la hipótesis de Battistini (5) respecto a la naturaleza degenerativa de las formas cocoides. Las características morfológicas ultraestructurales de las diversas formas del germen en el hematíe corresponden a las de una bacteria de pared gruesa, similar a la descrita en los gérmenes gram-positivos (18); la microcápsula que he descrito en algunas formas de *B. bacilliformis* y que mide aproximadamente 50 Å de grosor, puede ser propia, como la que se menciona en micobacterias (54), o puz-

de tratarse de la membrana del hematíe que ha sido arrastrada por el parásito durante el proceso de penetración, membrana que cubriría completamente al germen aislándolo de la matriz citoplasmática del glóbulo rojo. Los gránulos finos descritos en el citoplasma del germen, por su densidad y diámetro, probablemente corresponden a gránulos de material ribonucleoproteico, es decir, a ribosomas, como ya ha sido demostrado en otras bacterias usando técnicas similares y otras, como la técnica de la "Coloración negativa" y el estudio bioquímico de la fracción correspondiente obtenida por ultracentrifugación diferencial (13). En el curso de nuestra investigación no hemos observado otras estructuras citoplasmáticas de la *B. bacilliformis* como cuerpos densos, vacuolas y mesosomas que sí han sido descritas en otras especies bacterianas.

El citoplasma de la *B. bacilliformis* tiene membrana limitante de características similares a las descritas en otros microorganismos y otras células y que forma parte de lo que Robertson denominara "Unidad de membrana" (37), estructura que por ser muy delgada sólo es visible con el microscopio electrónico. Peters y Wigand (33) y posteriormente Pérez Alva y Giuntini (32) han demostrado con técnicas adecuadas, flagelos unipolares en la *B. bacilliformis* de cultivo. Las técnicas empleadas por estos autores permiten apreciar la bacteria entera, de modo que los detalles concernientes a superficie externa y apéndices siempre son visibles; en cambio, nuestros preparados representan secciones de tejido y de *B. bacilliformis*, técnica que no nos ha permitido observar flagelos. Las zonas citaras de estructura fibrilar y que no muestran membranas limitantes corresponden a material nuclear. Robinow (40) ha se-

ñalado, entre otras características del núcleo de las bacterias, la de ser de menor densidad que el citoplasma a diferencia de lo que ocurre en otras células y, la de poseer membrana nuclear. Kellenberg y Ryter (18) han demostrado la naturaleza fibrilar del material nuclear de las bacterias, fibrillas que tienen un grosor que varía entre 20 y 50 Å y que, de acuerdo a Lee (20), son digeridas con desoxirribonucleasa, lo que revela que están constituidas por ácido desoxiribonucleico.

Las observaciones clásicas han señalado que en la Fase Hemática de la enfermedad de Carrión hay un primer momento en que las formas bacilares son las únicas y que se encuentran en el hematíe; conforme evoluciona la enfermedad dentro de esta primera fase, aparecen las llamadas formas cocobacilares y cocoides y que, al final de la misma, las formas cocoides reemplazan a las cocobacilares y bacilares. Nuestras observaciones ultraestructurales demuestran que en el verrucoma existen formas cocoides, ovoides, cocobacilares y bacilares con predominio de las formas ovoides. Este hecho nos permite suponer que el cambio de forma bacilar a cocoide, señalado en la fase hemática, no debe ser absoluto, como aún se sostiene. Sin embargo, cabe la posibilidad que las formas cocoides y ovoides, en su proceso de multiplicación y desarrollo, influenciado por las condiciones del medio, pueden generar formas cocobacilares y bacilares; sólo así explicaríamos la presencia de estas formas en el verrucoma.

La variabilidad en las dimensiones de las diversas formas de *B. bacilliformis* encontradas en el verrucoma están sujetas a la discusión que se hizo en relación con el mismo fenómeno observado en hematíes de nuestro material.

Las diferencias sustanciales encontradas en la apreciación comparativa del tamaño de formas similares correspondientes a poblaciones de *B. bacilliformis* del hematíe y del verrucoma resulta interesante y sujeta a comentario. Esta diferencia puede ser aparente si suponemos un comportamiento diferente de los hematíes por una parte, y del tejido conectivo vascular por otra, frente a la técnica de procesamiento empleado para el estudio con el microscopio electrónico, diferencia que podría traducirse en una mayor retracción del tejido conectivo vascular y de los elementos que en él se encuentran. Por supuesto, cabe también la posibilidad que esta diferencia de tamaño de las diversas formas del germen a favor de las encontradas en la primera fase de la enfermedad sean reales; en dicho caso, el significado está sujeto a posteriores investigaciones. Estudiando la ultraestructura de la *B. bacilliformis* en el verrucoma, encontramos como hecho sustancial una pared bacteriana cuyo espesor representa, aproximadamente, la mitad de la señalada para las formas observadas en el hematíe; si esto es también resultado de una retracción del germen debido al procesamiento del material, tendríamos que aceptar que la pared sufre una mayor reducción que el resto de la estructura bacteriana. Cabe mencionar que el estudio ultraestructural de bacterias gram-positivas ha demostrado, en forma concluyente, que la pared bacteriana de éstas tiene un espesor que es más del doble que el de los gérmenes gram-negativos, hechos que tienen significado por la diferente composición química de ambos tipos de pared bacteriana (41). Por esta razón, sería sumamente interesante establecer, con otras técnicas, si la diferencia en el espesor de la

pared entre la *B. bacilliformis* de los hematíes y la *B. bacilliformis* del verrucoma es real, porque esto podría ayudarnos a explicar los fenómenos inmunológicos que operan en el curso de la enfermedad.

Las formas cocoides y ovoides con gránulos citoplasmáticos gruesos y ausencia de material nuclear probablemente representan formas degeneradas del germen en relación con el proceso fagocitario que se verifica a nivel del verrucoma.

La forma de multiplicación de las bacterias depende en parte de la estructura y naturaleza de su pared celular. Se ha señalado, en base a estudios con el microscopio de luz o convencional, que las bacterias gram-positivas, es decir aquellas de pared gruesa, se dividen a través de un mecanismo complejo que consiste en la formación de tabiques o puentes transversales de la pared bacteriana y que sirve como límite de separación de las bacterias hijas (39). También se han descrito formas combinadas de división bacteriana, es decir por tabicamiento incompleto seguido de estrangulación. Nuestras observaciones en hematíes y en el verrucoma son indicativos que la *B. bacilliformis* se divide por tabicamiento como lo hacen las bacterias gram-positivas, hecho que está de acuerdo con el grosor de la pared celular descrita en Bartonellas de hematíes. La multiplicación por tabicamiento de Bartonellas observadas en el verrucoma, aparentemente no concuerda con las características de su pared que, como ya habíamos mencionado, es de un grosor similar a la de las bacterias gram-negativas. El estrangulamiento asimétrico y simple, señalado en una de las formas bacterianas en el hematíe, parece corresponder a una angu-

lación artificial y no a una forma de división del parásito.

La presencia de una membrana que envuelve el glóbulo rojo y que tiene las características de la membrana celular en general, como hemos señalado en nuestras observaciones, ha sido descrita en secciones de hematíes impregnados con permanganato de potasio (37). Davson (8) se refiere a la estructura molecular de esta membrana, mencionando la naturaleza lipoproteica, similar a la descrita para la "unidad de membrana" de Robertson (37). Parece que estas consideraciones respecto a la estructura y naturaleza de la membrana del hematíe no satisfacen ciertos requisitos de sus características funcionales. Así, Hayden y Taylor (12), señalan que la membrana proteica-lipídica-proteica puede resultar, desde un punto de vista termodinámico, desfavorable para la función del hematíe. Últimos estudios de la superficie de eritrocitos de rata con el microscopio electrónico, usando técnicas de sombreado con metales y réplicas con carbón, revelan estructura granular a manera de burbujas del orden de 400 a 500 Å y material orgánico a manera de filamentos agregados que forman imágenes como las asas de alambre (12). Moskowitz y Calvin (12) piensan que el material fibrilar descrito como componente de la membrana globular correspondería a "elinina", la que estaría adherida al esqueleto de la membrana por material lipídico extractable por el éter y que recibe el nombre de "estromina".

De acuerdo a Ponder (36), la membrana del eritrocito, en estas condiciones, tendría un espesor de 1000 Å. Es posible que en el proceso de deshidratación e inclusión de los hematíes, por acción de los

solventes orgánicos, parte de la estructura de la membrana señalada por Glaeser y colaboradores (12) se desprenda y disuelva.

Weinstein y Stanley (50), usando la técnica de clivaje por congelación y replicación del hematíe, han observado, con el microscopio electrónico, superficie lisa cubierta por partículas pequeñas las que corresponderían a antígenos, enzimas o a alguna estructura proteica. En términos generales, los gránulos descritos en nuestro material como estructuras de mayor densidad periférica adheridos a la superficie de las laminillas de hematíes, pueden corresponder a estructuras propias de la membrana o a las partículas descritas por Weinstein y Stanley.

La presencia de vacuolas ocupadas por diversos tipos de elementos como ferritina, restos de organelas, etc. y cuerpos densos, ha sido descrita por Kent y colaboradores (19) en reticulocitos de pacientes anémicos, de personas esplenectomizadas que desarrollan posteriormente anemia y, ocasionalmente, en personas sanas. Se sabe que estas vacuolas, cargadas con gránulos de ferritina y organelas, son captadas por los macrófagos del Sistema Retículo Endotelial sin destrucción del hematíe. La relativa frecuencia con que encontramos estas vacuolas en nuestro material se explica por el alto índice reticulocitario que se observa en la Fase Hemática de la enfermedad de Carrión. Los cuerpos densos pueden ser una variedad de estos elementos eritrocíticos, es decir, que se trate de restos citoplasmáticos que han perdido estructura, o pueden corresponder a hemoglobina desnaturalizada. Schnitzer y Smith (42) han señalado que los llamados "Cuerpos de Heinz" observados con el microscopio de luz, en algunas condiciones patológi-

cas del hematíe, corresponden a los cuerpos densos vistos con el microscopio electrónico. A diferencia de las vacuolas autofágicas de los eritrocitos, los cuerpos densos determinarían la destrucción total del hematíe por los macrófagos del Sistema Retículo Endotelial. La escasa frecuencia con que estos cuerpos densos se observan en los hematíes de la Fase Hemática de la enfermedad de Carrión, aún en el caso que tuvieran el mismo significado que los "cuerpos de Heinz", hace suponer que su rol en la anemia hemolítica de esta enfermedad no debe ser importante.

La abundancia de vacuolas, especialmente periféricas, que se observa en algunas secciones finas de hematíes parcialmente hemolizados puede interpretarse como resultado de vesículas de micropinocitos confluentes. Grasso (14) ha demostrado en el citoplasma de los hematíes vesículas de pinocitosis. También podrían corresponder a vacuolas autofágicas que han perdido su contenido en el curso del proceso hemolítico.

En una publicación previa nos hemos referido al complejo Bartonella-hematíe (7). En esta oportunidad señalamos la presencia de gránulos que eventualmente se encuentran adheridos a la *B. bacilliformis* o a la pared de la vesícula eritrocítica que la contiene. El tamaño y las características ultraestructurales de estos gránulos son similares a los descritos en aquellos encontrados en la superficie de las laminillas del hematíe. Como ya mencionamos, estos gránulos pueden corresponder, entre otras cosas, a anticuerpos. La alta densidad electrónica observada en la periferia de estos gránulos se debería a su asociación con compuestos lipóidicos.

demostrada la presencia de la *B. bacilliformis* dentro del glóbulo rojo, cabe preguntarse ¿cuál sería el mecanismo de penetración del germen en el hematíe?. En nuestras observaciones hemos anotado la presencia de prolongaciones alargadas y delgadas del hematíe, cada una de las cuales llegan a envolver Bartone-lias incluyéndolas dentro del citoplasma globular. Fawcett (10) y Policar y Bessies (35) se refieren a un fenómeno similar que ocurre en un tipo de células que desarrollan in vitro, en células endoteliales y células libres como leucocitos, macrófagos y células tumorales de líquido ascítico; estos autores mencionan el fenómeno como característico de pinocitosis, diferente por cierto a la llamada micropinocitosis y a la fagocitosis. Al parecer, este fenómeno no ha sido descrito en hematíes pero, en base a nuestras observaciones, creemos razonable señalar que la *B. bacilliformis* ingresa al glóbulo rojo por pinocitosis.

Las células descritas como tipo A tienen las características ultraestructurales de la célula reticular descrita en el mesénquima primitivo y en los órganos linfo-hematopoyéticos. Se sostiene que la célula mesenquimal primitiva da origen a las células mesenquimales adultas, vale decir, histiocitos, células endoteliales, fibroblastos, células sanguíneas, etc. Sin embargo, cabe recordar que no todas las células mesenquimales primitivas necesariamente evolucionan y se transforman en otras células diferenciadas; muchas persisten como tales en la vida adulta del individuo y, por lo tanto, tienen capacidad para diferenciarse en otro tipo de célula en cualquier momento de la vida (15). Siendo así, la célula tipo C que tiene las características ultraestructurales de la célula endotelial, se originaría en la célula

reticular. Esta interpretación tiene su fundamento en la presencia de las células tipo B que, por sus características ultraestructurales, corresponden a una célula intermedia entre las reticulares y las endoteliales.

La célula tipo D tiene las características ultraestructurales de la célula histioma-crofágica y posiblemente también se origina de la célula reticular. La célula tipo E corresponde al fibroblasto, de allí su íntima relación con fibras de colágeno.

La sustancia descrita como intersticial es material intercelular no fibrilar y probablemente está constituida por mucopolisacáridos, sustancias identificadas desde las investigaciones de Meyer (25) como componentes de la llamada "sustancia fundamental" de los tejidos. La membrana basal que se forma subyacente a las células endoteliales tiene un origen discutido, pero bien puede representar un polímero de mucopolisacáridos que se encuentran en la sustancia intersticial.

La presencia de vesículas libres y fragmentos celulares dispersos en la sustancia intersticial es indicativo de destrucción celular, de suerte que, en la lesión eruptiva de la enfermedad de Carrión, a la par que proliferan cierto tipo de células también se produce muerte celular. Nuestras observaciones ultraestructurales permiten establecer la relación estrecha que existe en la *B. bacilliformis* y los diversos componentes de la lesión eruptiva. Son las células tipo B, C, y D las que, por mecanismos de fagocitosis, atrapan al germen que se encuentra en la sustancia fundamental. La capacidad fagocítica de las células endoteliales no sólo ha sido reconocida en los órganos del sistema Reticulo Endotelial, sino en endotelios independientes de este sistema (6). Sin embargo, es de notar que la capaci-

dad fagocitaria de las células tipo B y C, que como mencionamos tienen las características de célula intermedia entre reticular y endotelial respectivamente, es muy limitada si comparamos con la capacidad fagocitaria de la célula tipo D que corresponde a macrófagos.

La capacidad de multiplicación de la *B. bacilliformis* en el citoplasma de los macrófagos se debería a la escasa cantidad de cuerpos densos, probablemente lisosomas, que estas células poseen.

La capacidad destructiva o la digestión de los gérmenes por los macrófagos debe ser limitada, lo que daría lugar a que estas células se carguen de microorganismos hasta causar el estallido y destrucción de las mismas, dejando paso a un gran número de bacilonemas que quedarían libres en la sustancia intersticial, las que nuevamente serían fagocitadas por otras células. Esto estaría de acuerdo con algunas observaciones llevadas a cabo por Urteaga y Calderón (47) en sus estudios con el microscopio de luz.

Por lo expuesto, la erupción verrucosa debe considerarse como manifestación de la quiebra en el equilibrio biológico huésped-parásito a favor del huésped en la mayoría de los casos. El mencionado equilibrio probablemente se establece en el llamado Período pre-eruptivo de Weiss. Ya este autor ha señalado las llamadas formas frustras de brote verrucoso cuyo significado debe ser la paralización de la lucha entre el parásito y el huésped por romper el equilibrio biológico, fenómeno que debe estar ligado íntimamente al mecanismo inmunológico que opera en esta enfermedad. Igualmente, el brote eruptivo miliar florido, la erupción nodular y la mular deben representar grados severos de esta lucha dependiente del

número de gérmenes o de la sensibilidad tisular frente a la agresión.

La enfermedad de Carrión es una entidad infecciosa producida por la *B. bacilliformis*, germen que, después de un período de incubación, se presenta en la circulación periférica con la particularidad muy especial de parasitar los glóbulos rojos produciendo, probablemente, alteraciones de la membrana citoplasmática de estos elementos fomes lo que determinaría que las células del Sistema Reticulo Endotelial reconozcan al hematíe como anormal y lo destruyan causando la anemia propia de esta fase de la enfermedad. Durante el período anémico hay una inhibición, o tal vez un agotamiento de la función del aparato inmunológico, hecho que se traduce por un estado de hipoergia o anergia que determina la instalación de procesos intercurrentes muy bien señalados en varios trabajos de investigación. Superada esta crisis la *B. bacilliformis* posiblemente se mantiene en estado de latencia en las células del RES estableciéndose un equilibrio entre el huésped y el parásito que puede mantenerse por un tiempo variable que corresponde al llamado período intercalar o período pre-eruptivo. Al romperse este equilibrio se instala el período eruptivo, que no es sino la expresión de la lucha entre el parásito y el huésped, período que generalmente precede a la curación.

Consideramos que se requiere profundizar conocimientos básicos sobre la *B. bacilliformis* en lo que respecta a sus características ultraestructurales *in vitro* y su comportamiento antigénico; estudiar los cambios ultraestructurales del Período pre-eruptivo y la respuesta del huésped desde un punto de vista inmunológico pa-

ra tener una idea completa de los mecanismos que operan en esta enfermedad, que sin duda constituye un modelo sui generis en la patología infecciosa.

CONCLUSIONES

1. Las diferentes formas de *Bartonella bacilliformis* que parasitan los glóbulos rojos tienen características ultraestructurales de bacteria y como tal están constituidos por núcleo, citoplasma, membrana citoplasmática, pared bacteriana y posiblemente microcápsula.

2. Las dimensiones expresadas en milimicras de las diferentes formas de *B. bacilliformis* en los hematíes son las siguientes:

Ovoides: $603.33 \pm 33.86 \times 405.00 \pm 28.46$ milimicras.

Cocobacilares: $977.16 \pm 20.39 \times 451.88 \pm 14.82$.

Bacilares: $1,494.50 \pm 33.30 \times 313.75 \pm 31.30$.

3. Las diferentes formas de *B. bacilliformis* que parasitan los hematíes no muestran diferencias ultraestructurales, por consiguiente las descritas como ovoides con el microscopio convencional no constituyen formas degeneradas de *B. bacilliformis*.

4. En el verrucoma se encuentran todas las formas de *B. bacilliformis* descritas en los hematíes con características ultraestructurales semejantes a aquéllas. Sin embargo, las del verrucoma son más pequeñas y tienen pared bacteriana más delgada.

5. Las dimensiones de las diferentes formas de *B. bacilliformis* expresadas en milimicras, en el verrucoma son las siguientes:

Ovoides: $335.79 \pm 11.21 \times 196.84 \pm 7.29$.

Cocobacilares: $645.00 \pm 60.02 \times 282.00 \pm 20.43$.

Bacilares: $1,089.23 \pm 77.39 \times 203.84 \pm 15.03$.

6. La *B. bacilliformis* que penetra el hematíe y la que se encuentra en los verrucomas se multiplica por tabicamiento completo.

7. La *B. bacilliformis* penetra en el hematíe por pinocitosis.

8. El verrucoma, ultraestructuralmente, está constituido por diferentes tipos de células mesenquimales, siendo la célula de aspecto reticular la que probablemente da origen a los otros.

9. Tres de las células mesenquimales descritas en el verrucoma, una de ellas con características de célula endotelial y otra con características de macrófago, fagocitan *B. bacilliformis*. Sin embargo, la célula que fagocita mayor número de parásitos es el macrófago.

10. Los macrófagos del verrucoma tienen escasos lisosomas, hecho que debe de estar relacionado con la viabilidad y multiplicación de la *B. bacilliformis* fagocitadas por estas células.

11. La marcada proliferación de células histio-endoteliales y la destrucción parcial de las mismas en el verrucoma, se debería a la escasa capacidad digestiva que se sugiere tienen los macrófagos de la lesión eruptiva.

12. A la luz de las observaciones ultraestructurales de hematíes y verrucomas en la enfermedad de Carrión pueden plantearse probables mecanismos que expliquen algunos fenómenos conocidos en la enfermedad:

a) Que la eritrofagocitosis, responsable de la anemia severa en el primer período de la enfermedad, se debería a modificaciones de la membrana del hematíe, causadas por acción directa o in-

directa de la *B. bacilliformis* al constituirse el Complejo Bartonella-hematíe.

b) Que la hipergia o anergia que se establece en el Período Hemático de la enfermedad sería resultado de la inhibición, agotamiento o distracción funcional del aparato inmunológico como resultado de la intensa eritrofagocitosis.

c) Que el llamado Período pre-eruptivo sería el resultado del equilibrio que debe de establecerse entre el parásito y el huésped después de superada la crisis hemática, la que se caracterizaría por cierta tolerancia de los tejidos del huésped frente a la presencia del parásito que posiblemente seguiría proliferando y,

d) Que la erupción verrucosa sería expresión de la quiebra del equilibrio huésped-parásito, la que conduciría a la expulsión total o, en ocasiones, sólo parcial del agente que parasita las células del huésped.

RESUMEN

En la Enfermedad de Carrión (*Bartonellosis humana*), se ha descrito dos fases: 1) Fase hemática y 2) Fase histioide.

En la Fase hemática, recientemente se ha demostrado que la *Bartonella bacilliformis*, agente etiológico de la Enfermedad, se encuentra dentro de los hematíes del huésped.

En la Fase histioide se describe dos períodos: 1) Período pre-eruptivo y 2) Período eruptivo o brote verrucoso. El cuadro histológico del botón verrucoso es el de un hemangioma capilar o de un granuloma piógeno; sin embargo, en ocasiones el diagnóstico diferencial con otras entidades, especialmente con neoplasias malignas, es difícil. Con técnicas espe-

ciales de coloración, se ha observado en el citoplasma de células histioides del verrucoma gránulos pequeños que han sido considerados como forma de *B. bacilliformis*.

En el presente trabajo se da a conocer los resultados del estudio ultraestructural del complejo Bartonella-hematíe y del verrucoma para lo cual se han usado secciones finas de sangre coagulada, de sangre desfibrinada, de hematíes hemolizados y de verrucomas floridos no complicados.

Se establece que en el verrucoma existen las tres formas de *B. bacilliformis* descritas clásicamente en los hematíes, es decir, formas bacilares, cocobacilares y cocoides, considerando que esta última forma, desde el punto de vista ultraestructural, es predominantemente ovalada. La *B. bacilliformis*, en los hematíes, tiene las características de bacteria con pared gruesa como la descrita en gérmenes gram-positivos; sin embargo, la *B. bacilliformis* del verrucoma, siendo ultraestructuralmente similar, tiene pared bacteriana delgada, diferencia que es discutida en cuanto a su posible significado. De otro lado, las diferentes formas de *B. bacilliformis* del verrucoma son más pequeñas que sus homólogas del hematíe, considerándose que esta diferencia puede ser artificial, dependiente de una mayor o menor retracción de los tejidos frente a los reactivos usados en la preparación de las inclusiones para la obtención de secciones finas.

Por las observaciones realizadas se deduce que la *B. bacilliformis* es incorporada en el seno del glóbulo rojo por fagocitosis. Este germen se multiplica en el hematíe y en el citoplasma de algunas células del verrucoma por tabicamiento completo transversal.

El verrucoma florido no complicado está constituido por varios tipos de células que, probablemente, se originan de la célula más primitiva; tres de ellas, entre las que figura la célula endotelial, tienen capacidad para fagocitar bartonellas, siendo el macrófago el que ejerce mayor actividad fagocitaria. Entre los elementos celulares del verrucoma se observa "sustancia fundamental", detritus celulares, fibras de colágeno y bartonellas.

El macrófago del verrucoma se caracteriza por poseer escasos lisomas, hecho que se discute en relación con las características del complejo *B. bacilliformis*-Verrucoma.

A la luz de las observaciones ultraestructurales de la Fase Hemática y del Período Eruptivo de la Enfermedad de Carrion, se hacen algunas consideraciones sobre la relación huésped-parásito y la proyección que estos hallazgos pueden tener en la mejor comprensión del mecanismo inmunológico de este proceso infeccioso.

SUMMARY

In Carrion's disease (human bartonellosis) there are two phases, the Hematic and the Histiocytic. It was recently demonstrated by electron microscopy that in the hematic phase, the etiologic agent of the disease, (*Bartonella bacilliformis*) is located within the red blood cell. In the Histiocytic phase is recognized a Pre-eruptive and an Eruptive stages. The Eruptive stage is characterized by the presence of nodules in the skin which are called "verrugas", or this stage is also known as "verruca peruana". The histologic feature of "verruca" is an angioma-like lesion. Sometimes the differential diagnosis with benign or malign neoplasms

is extremely difficult. Using Giemsa's stain, small granules can be seen within the histiocytic cells which are considered to be *B. bacilliformis*.

The present paper deals with the ultrastructure of *Bartonella*-erythrocyte complex and of the "verruca". For this purpose, ultrathin sections of erythrocytes parasitized by *B. bacilliformis* and of "verrugas" have been examined by electron microscopy. The study concerns four patients whose blood smears showed *B. bacilliformis* as parasitizing over 53 per cent of the red cells and five patients showing skin lesions characteristics of Eruptive stage of Carrion's disease. Bacillary, coccoid-bacillary, and coccoid forms of *Bartonella bacilliformis* are seen in the red cells as well as in "verrugas". The microorganism is enclosed in the red cells by pinocytosis. In the "verrugas", *B. bacilliformis* are smaller and showed a thinner bacterial wall compared with those described within the red cells. These microorganisms divide by complete cross wall in the red cells and in cells of the "verruca".

"Verrugas" are formed by several types of mesenchymal cells, all of them probably derived from the stem type cell which is also present in the lesion. Three of these types, including the endothelial cell, phagocytize *B. bacilliformis*; however, the macrophage, which shows scanty lysosomes, has greater ability than other mesenchymal cells to engulf bartonella. Between mesenchymal cells are seen cell detritus, ground substance, collagen fibers and bartonella.

The electron microscopic findings concern to *Bartonella*-Erythrocyte complex and "verrugas" are discussed in relationship to pathogenesis and nature of Carrion's disease.

BIBLIOGRAFIA

1. Aldana, L.: Bacteriología de la Enfermedad de Carrión. Crón. Méd. Lima, 46: 235-236, 1929.
2. Aldana, L.: Estudios Biológicos de la Bartonella en la Enfermedad de Carrión. Rev. San. Poli. Lima, 7: 391-402, 1947.
3. Arce, J.: Apuntes sobre la Enfermedad de Carrión. Crón. Méd. Lima, 30: 325-336, 1913.
4. Barton, A. L.: Descripción de los Elementos Endoglobulares hallados en los Enfermos de Fiebre Verrucosa. La Crón. Méd. Lima, 26: 7-10, 1909.
5. Battistini, T.: "Estudio sobre la Verruga Peruana". Bol. Dir. Salub. Pub. Lima, 1927. Pág. 191.
6. Cotran R. S.: Endothelial Phagocytosis: An electron microscopy study. Exp. Mol. Path. 4: 217-231, 1965.
7. Cuadra, M. and Takano, J.: The Relationship of Bartonella bacilliformis to the Red Blood Cell as Revealed by Electron Microscopy. Blood 33: 708-716, 1969.
8. Davson, H.: Growth of the concept of the Paucimolecular membrana. Circulation, 26: 1022-1035, 1962.
9. Escomel, E.: Anatomie Pathologique du Verrucome de Carrión. Ann. de Dermat. et Syph., 3: 961-984, 1902.
10. Fawcett, D. W., in: Siegel, B. M. (Ed) "Modern Developments in Electron Microscopy". Pág. 265, Academic Press, New York, 1964.
11. Gastiaburú, J. C. y Rebagliati, R.: Sobre la Hematología y Etiología de la Enfermedad de Carrión. I.a Crón. Méd. Lima, 26: 377-384, 1909.
12. Glaeser, R. M.; Hayes, T.; Mel, H. and Tobies, C.: Membrane Structure of Os O4 Fixed Erythrocytes Viewed "Face on" by Electron Microscope Techniques. Exp. Cell. Res. 42: 467-477, 1966.
13. Glauert, A. M.: The Fine Structure of Bacteria. Brit. Med. Bull. 18: 245-250, 1962.
14. Grasso, J. A. Cytoplasmic Microtubules in Mammalian Erythropoietic Cells. Ant. Record 156: 397-411, 1966.
15. Ham, A. W. and Leeson, T. S.: "Tratado de Histología". 4a. Ed., Pág. 234. Ed. Interamericana. México, 1964.
16. Herculles, O.: Ligeros Apuntes sobre la Histología Patológica de la Verruga Peruana. Crón. Méd., Lima, 18: 3-11, 1901.
17. Herculles, O.: "La Anatomía Patológica de la Verruga". V Congreso Méd. Latinoamer. y VI Panamer. Lima, Tomo II, 1914.
18. Kellenberg, E. and Ryter, A.: Cell wall and cytoplasmic membrane of Escherichia coli. J. Biophys. Biochem. Cytol. 4: 323-326, 1958.
19. Kent, G.; Minick, O. T.; Volino, F. I. and Orfei, E.: Autophagic Vacuoles in Human Red Cells. Am. J. Path. 48: 831-857, 1966.
20. Lee, S.: Ferritin labelled antibody as an electron stain for phage protein. Exp. Cell. Res. 21: 249-252, 1960.
21. Mackehenie, D. y Battistini, T.: "Contribución al estudio de la verruga peruana". Arch. de la Asoc. Per. para el progreso de la Ciencia. 2 (1): 14-16, 1922.
22. Mackehenie, D. y Weiss: Contribución al estudio de la verruga peruana. Gaceta Médica Peruana, Lima, 4 (18): 51-59, 1926.
23. Mackehenie, D.: Estudio del noduloma verrucoso. Reforma Méd., Lima, 24: 50-53, 1938.
24. Mayer, M.; Rocha Lima, H., y Werner, H.: Investigaciones sobre la Verruga Peruana. Crón. Méd. Lima, 30: 193, 1913.
25. Meyer, K.: The Chemistry and Biology of the Mucopolysaccharides and Glycoproteins. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology 6: 91, 1938.
26. Millonig, G.: Advantages of a Phosphate Buffer for Os O4 Solutions in Fixation. J. Appl. Physiol. 32: 1637, 1961.
27. Millonig, G.: A modified procedure for lead staining of thin sections. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11: 763, 1961.
28. Monge, C.: Cuerpos endoglobulares X encontrados en la sangre verrucosa. La Crónica Médica, Lima, 29: 640, 1912.
29. Noguchi, H.; Battistini, T.: Etiology of Oroya Fever: II Cultivation of Bartonella bacilliformis. J. Exp. Med. 43: 851-857, 1926.

30. Noguchi, H.: Etiology of Oroya Fever: II. The viability of *Bartonella bacilliformis* in Cultures and in the Preserved Blood and Excised Nodules of *Macacus Rhesus*. *J. Exper. Med.* 44: 533-538, 1926.
31. Odriozola, E.: "La Maladie de Carrión en la Verruga Peruvienne". Ed. G. Carre et C. Naud. Paris, 1898.
32. Pérez Alva, S. et Giuntini, J.: La Maladie de Carrion. Etude Morphologique de *Bartonella bacilliformis* au Microscope électronique. *Bulletin de la Soc. de Path. Exotique*, 2: 188-199, 1957.
33. Peters, D., and Wigand, R.: *Bartonellaceae*. *Bact. Rev.* 19: 150-155, 1955.
34. Pinkerton, H., and Weinman, D.: Carrión's Disease: Comparative Morphology of the Etiological Agents in Oroya Fever and Verruga Peruviana. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 37: 591-611, 1937.
35. Policard, A., and Bessies, M.: A method of incorporation of macromolecules into the cells as determined by the electron microscope: rhopheocytosis. *Compt. Rend.* 246: 3194-3197, 1958.
36. Ponder, E.; in: Brachet, J. and Mirsky, A. E. (Eds.) "The Cell" Vol. 2, Pag. 1, Academic Press, New York, 1963.
37. Robertson, J. D.: The ultrastructure of cell membranes and their derivations. *Biochem. Soc. Symp.* 16: 3-43, 1959.
38. Robertson, J. D. in: Lucke (Ed.) "Cellular Membranes in Development". Pag. 1, Academic Press, New York, 1963.
39. Robinow, C. F.: in: Dubos, M. J. "The Bacterial cell in its relation to Problems of Virulence. Immunity and chemotherapy". Addendu, p. 353, Harvard University Press, Cambridge, Mass, 1945.
40. Robinow, C. F.: Morphology of the bacterial nucleus. *Brit. Med. Bull.* 18: 31-35, 1962.
41. Salton, M. R. J.: The anatomy of the bacterial surface. *Bact. Rev.* 25: 77-95, 1961.
42. Schnitzer, B. and Smith, E. B.: Observations of Phagocytized Red Cells Containing Heinz Bodies. A light and electron microscopic study. *The Am. J. Clin. Path.* 45: 538-545, 1966.
43. Sporluck, B.; Kattine, J. and Freeman, J.: Technical modifications in Maraglas Embedding. *J. Cell. Biol.* 17: 203-213, 1963.
44. Strong, R. F.; Tyzzer, E. E.; Brues, C. T.; Sellards, A. W. and Gastiaturú, J. C.: Verruga Peruana. Oroya Fever and Uta. *J.A.M.A.* 61: 1713-1729, 1913.
45. Sundberg, R. D., and Brown, H.: The application of the Prussian blue stain to previously stained films of blood and bone marrow. *Blood* 10: 160-165, 1955.
46. Tamayo, M. C.: "Histología Patológica de la Verruga Nodular". Tesis, Lima, 1899.
47. Urteaga, O., y Calderón, J.: Ciclo Biológico de Reproducción de la *Bartonella bacilliformis* en los tejidos de pacientes de Verruga Peruana o Enfermedad de Carrión. *Arch. Peruanos Pat. Clin.* 19: 1-84, 1965.
48. Valentini, R. C.: Quantitative Electron Microscopy of Leprosy Bacilli. *Brit. Med. Bull.* 18: 242-244, 1962.
49. Vélez, A.: "De las Verrugas". Tesis, Lima, 1861.
50. Weinstein, R. S., and Bullivant, S.: The application of Freeze Cleaving Technics to studies on Red Blood cell Fine Structure. *Blood*, 29: 780-789, 1967.
51. Weiss, P.: Hacia una concepción de la Verruga Peruana. Tesis, 1927. *An. Fac. de Med.*, Lima 9: 279-299, 1926.
52. Weiss, P.: Verruga Peruana. *Rev. Soc. Per. Derm.* 1: 9-27, 1967.
53. Wigand, R.; Peters, D. and Urteaga, B. O.: Neue untersuchungen über *Bartonella bacilliformis*. *Tropenmed, Parasit.* 4: 539-544, 1953.
54. Wilkinson, J. F.: The extracellular polysaccharides of bacteria. *Bact. Rev.* 22: 46-73, 1958.