

# BARTONELLOSIS. CULTIVO DEL TEJIDO DEL VERRUcoma\*

MANUEL CUADRA \*\*

Alzamora Castro (1938-1945) (1) hizo el primer intento de cultivar el tejido del Verrucoma, aparentemente sin éxito.

La patogenia del Verrucoma y el significado de la Bartonella bacilliformis presente en los angioblastos, bajo las formas de bacteria, según unos autores, y la de cuerpo de inclusión o de virus, según otros, constituyen enigmas a cuyos desentrañamiento podrían llevar alguna luz las técnicas modernas de los cultivos de tejidos.

Hemos logrado hacer proliferar in vitro las células del tejido verrucoso; este hecho, más los resultados de la búsqueda del supuesto agente inductor del Verrucoma, la B. bacilliformis, en las células en multiplicación deseamos hacer conocer en la presente comunicación.

## MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS

*Paciente verrucoso.* Los estudios fueron realizados con dos nódulos verrucosos subdérmicos (Verruga nodular) extirpados en distintas oportunidades de un paciente (T. F. C., Sala San Vicente, cama 16, Hospital Dos de Mayo) de 23 años de edad, nacido en Huancavelica y procedente de Cajatambo (zona verrucógena) en la que reside 5 meses y que presentaba erupción generalizada, predominantemente en miembros inferiores, de los tipos dérmico (eflorescencias rojas) y subdérmico (tumorações recubiertas de piel sana). La erupción se había iniciado dos meses atrás con discretas molestias generales y no fue precedida de anemia.

---

\* Trabajo realizado en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina de la U. N. M. S. M. (2º piso, I. de Medicina Social).

\*\* Profesor Asociado de Medicina Tropical, F. Medicina, U. N. M. S. M.

*Toma de la muestra.* Nódulo subdérmico del tamaño aproximado de una pequeña aceituna situado en el tercio inferior, parte anterior, del muslo izquierdo. Afeitada de los vellos y lavado de la piel con agua y jabón. Desinfección con tintura de yodo y eliminación del metaloide con alcohol corriente. Lavado con suero fisiológico estéril. Anestesia por infiltración de novocaína, sin comprometer el nódulo. Incisión de la piel en losange y extirpación de la losange cutánea (tapa del nódulo verrucoso). Extracción del nódulo e introducción en medio de cultivo de tejidos sin antibióticos.

El medio de cultivo de células (Medio de crecimiento) utilizado por nosotros, con ligeras variantes de lo establecido por sus creadores (2) (3) es el siguiente: Solución Salina Balanceada de Earle 87.5; suero de vaca 10; hidrolizado de lactoalbúmina 0.5; sol. de bicarbonato de sodio 2.5 (de una sol. al 1.4%). Total 100 cc.

*Fragmentación del nódulo verrucoso.* Se eliminó el tejido adiposo que recubría al nódulo. Una pequeña porción de él, de algo menos que 1 cm<sup>3</sup> de volumen, fue introducido en un frasquito pequeño de boca ancha, de más o menos 5 cms. de alto, que contenía 1 cc de medio de crecimiento de tejidos sin antibióticos (Párrafo anterior); dentro de él fue reducido a minúsculos fragmentos de más o menos 1 mm<sup>3</sup> de volumen mediante cortes al azar practicados con tijera fina, dando una suspensión espesa como resultado (papilla).

*Cultivos de los fragmentitos.* La "papilla" fue lavada dos veces, suspendiéndola en 5 cc de medio de crecimiento y luego centrifugando. El sedimento fue finalmente suspendido en 10 cc de medio de crecimiento y distribuido en tubos de 12 1/2 por 1 1/2 con tapa de rosca, 1 cc por cada tubo, conteniendo de 10 a 20 fragmentitos cada uno. Incubación a 37° en posición inclinada. A las 48 horas se hizo la primera microscopía (Microscopio invertido Leitz) y el primer cambio de medio de crecimiento, eliminando el "medio viejo" con una pipeta Pasteur, cuidando de no lastimar los fragmentos. Posteriormente los exámenes fueron hechos diariamente y los cambios de medio de cultivo en caso de que se hubiera tornado amarillo (pH ácido).

El primer examen microscópico reveló que varios fragmentitos habían quedado adheridos a la pared del tubo y otros permanecían suspendidos; de la base de los primeros pudo advertirse el nacimiento de numerosas células adheridas al vidrio y formando una capa ("monolayer"), con núcleos destacados y protoplasma alargado (aparición

fasciculada en conjunto). En los días subsiguientes se constituyeron rápidamente amplios "monolayers", visibles macroscópicamente, formados por células lanceoladas en disposición radiada a punto de partida de los fragmentitos (Figs. 1 y 2).

De los tubos con abundante desarrollo pudo ser pasado (repicaje) a nuevos tubos, a los 35 días, mediante el método de la tripsinización (3) (4) (5). Estas resiembras a las 48 horas mostraron vigorosos "monolayers", los que en los días siguientes formaron una capa muy tupida y con un poder metabólico intenso apreciado por la rapidez de acidificación del medio de cultivo. Se mantuvieron vivas (acidificación del medio y células de aspecto saludable), aunque ya sin multiplicarse, durante tres meses a cuyo término quedaban pocas células y con franco aspecto degenerativo. Se hizo la tentativa de un segundo repicaje, de cultivos florecientes obtenidos con el primer repicaje y de 30 días de edad, pero las células escasamente se redondearon con la solución tripsina-versene (6) (7) (8), sin llegar a desprenderse hasta las tres horas. En vista de ello se lavaron los cultivos (eliminación de la tripsina-versene) y se añadió medio fresco de crecimiento; las células recuperaron su forma poligonal manteniéndose vivas por tres meses.

*Búsqueda de virus en los cultivos.* De 4 tubos que mostraban exuberantes "monolayers" y que estaban incubados a 37°, el líquido sobrenadante fue aspirado e inoculado en frasquitos con cultivo de tejidos (líneas establecidas), dos de HeLa y dos de Amnios Humano. Se usó medio de mantenimiento (2% de suero de vaca en lugar de 10) sin antibióticos. No se produjo efecto citopático. Tampoco, en ninguno de los tubos, se produjo efecto citopático espontáneo.

*Intento de cultivar la Bartonella de los cultivos de tejido verrucoso.* De un tubo que mostraba abundante desarrollo de tejido verrucoso fue aspirado el medio de crecimiento e inoculado en su lugar medio de crecimiento para Bartonellas (Caldo-sangre de Herccelles) (9). Incubación a 28°. No hubo en absoluto crecimiento de ningún germen hasta los 108 días.

*Intento de cultivar la Bartonella del nódulo verrucoso.* Fueron inoculados fragmentitos de nódulo verrucoso en caldo sangre de Herccelles. No hubo desarrollo de Bartonellas ni de ningún otro germen hasta por 78 días que duró el control.

*Intento de cultivar la Bartonella de la sangre.* Fueron practicados

dos hemocultivos en caldo corriente con 12 días de intervalo. Los dos resultaron negativos.

*Búsqueda de la Bartonella en secciones de nódulos.* Las secciones histológicas de nódulo verrucoso coloreadas con hematoxilina-eosina, mostraron la arquitectura conocida del tejido angiomatoso, mas no Bartonellas o inclusiones clamidozoarias en sus células.

*Búsqueda de Bartonellas en frotises de tejido verrucoso.* Pequeños fragmentos de tejido verrucoso fueron frotados muy suavemente en portaobjetos a modo de obtener células íntegras; así como preparaciones por impresión. Las preparaciones coloreadas con Giemsa mostraron numerosas células, mas no Bartonellas, sean las formas corrientes o las formas clamidozoicas.

*Búsqueda de Bartonellas en los cultivos de tejido verrucoso.* Los "monolayers" coloreados con Giemsa mostraron células grandes, alargadas (Figs. 3 y 4), con núcleos ovalados y varios nucleolos. Algunas células mostraban partículas finas de color rojo que ocupaban difusamente el protoplasma o eran zonales en otros casos (¿mitocondrias? ¿organelas?). En ningún caso fueron vistas imágenes compatibles con Bartonellas ni fuera ni dentro de las células. Otras células mostraban vacuolas y algunas otras masas hialinas rojas.

*Cultivo del segundo nódulo verrucoso.* Nueve días después de la primera extirpación se hizo la ablación de un segundo nódulo subdérmico de color azulado, del tamaño de una uva pequeña, situado en la cara ántero-lateral del tercio inferior de la pierna izquierda, cuya presencia fue notada por el paciente desde 15 ó 20 días atrás. Al seccionarle por la mitad se encontró un coágulo de sangre en su interior que explica el color azulado. La fragmentación y los cultivos fueron realizados con el método ya descrito, obteniéndose resultados semejantes a los hallados con el primer nódulo.

Los intentos de aislamiento de Bartonellas de este segundo nódulo (fragmentos sembrados en caldo-sangre) fueron negativos.

Un fragmento vermiforme de mas o menos 1 cm. de largo obtenido por aspiración de un tercer nódulo con jeringa y aguja N° 20 y cultivado en caldo sangre no dió lugar a desarrollo de Bartonellas (Control durante 32 días).

## DISCUSION

Hemos podido obtener fácilmente la multiplicación in vitro de las células del Verrucoma. No hubo necesidad de fijar previamente los fragmentos a las paredes del tubo de vidrio, sea con plasma de gallina, tal como está establecido (10) (11) (12) (13) (14) (15), ó calentando de antemano el tubo a 45° (16). Con el método señalado hemos logrado también obtener el desarrollo de fibroblastos de embriones de gallina en una cantidad tan abundante y confluyente que semejan "monolayers" preparados por dispersión con tripsina de fragmentos de órganos (4) (5) (3) (Será publicado).

Hubimos de actuar con extremas precauciones de asepsia pues la eliminación de antibióticos de los medios de cultivo, para no interferir la multiplicación de la Bartonella, exponía los cultivos a la contaminación. Nuestro primer intento de cultivar el nódulo verrucoso en 1964, de un paciente con verrucomas subcutáneos que Aldama había puesto a nuestro alcance, fracasó por contaminación bacteriana. Con algún retraso hemos logrado finalmente cultivar el tejido verrucoso; retraso debido a que aguardábamos pacientes apropiados, con verrucomas subdérmicos (recubiertos de piel sana), ya que los verrucomas que comprometen la piel (eflorescencias rojas) se encuentran altamente contaminados (17) (18).

No nos parecen concluyentes las pruebas, en especial la documentación fotográfica, de que Alzamora Castro (1) hubiera logrado cultivar el tejido verrucoso empleando técnicas recomendadas por Fischer (19) en 1927 y por Schaffer (20) en 1928.

Nos toca precisar, en primer lugar, cuál es el tipo de célula que entra en multiplicación. El tejido verrucoso es esencialmente vascular y el angioblasto es la célula predominante desde que él forma las paredes de una tupida red de capilares y el endotelio de los vasos mayores (21) (22) (23) (24) (25). La tendencia de los angioblastos a la multiplicación es muy pronunciada, pues las paredes de los vasos frecuentemente muestran hiperplasia a dichas células (21) (22); además existen, diseminados, nidos compactos de angioblastos (22). En las mallas de la trama vascular (espacios intersticiales) existen elementos conjuntivos, histiocitos y leucocitos, cuya predominancia relativa depende de diversos factores (edad del nódulo, infecciones secundarias). Según Makehenie (25) en los verrucomas iniciales predominan los histiocitos, en los adultos los angioblastos y en los termina-

les los fibroblastos. Los verrucomas que hemos estudiado, cuya edad clínica no pudo determinarse, eran de tamaño muy apreciable; la microscopía de sus secciones histológicas mostró arquitectura vascular predominante con relativamente escaso componente intersticial. Bajo estas condiciones creemos que en los cultivos entraron en multiplicación tanto angioblastos como fibroblastos, cuya demarcación es imposible de efectuarse.

Nuestros intentos de cultivar la Bartonella de la sangre del enfermo, de fragmentos del verrucoma mismo, o recuperarla de los cultivos del verrucoma han sido infructuosos; tampoco pudieron ser vistos gérmenes en las células de los cultivos (monolayers). La Bartonella es un germen de relativamente marcada resistencia (26). De acuerdo a nuestra experiencia el medio de cultivo de Herccelles (caldo corriente - glóbulos rojos) (9), con el que hemos trabajado, es excelente, tanto para aislamientos primarios cuanto para subcultivos. El medio de cultivo de tejidos que hemos empleado (Solución Salina Balanceada de Earle (2) como base) o el de Melnick (3) son variables en sus resultados frente a la multiplicación de la Bartonella; la adición de glóbulos rojos favorece indiscutiblemente la multiplicación. En definitiva no hemos podido localizar a la Bartonella obligándonos este hecho a dar una explicación.

La negatividad nos hace pensar o que el Verrucoma no es causado por la Bartonella, o que ésta por alguna razón no estaba presente en el tejido verrucoso, o que los medios de cultivo han sido inapropiados. La posibilidad de que la erupción verrucosa no sea determinada por la Bartonella, que fue motivado de candente controversia en el pasado, nos parece muy remota, pues en efecto, numerosos autores han certificado su inoculabilidad (Cuadro N° 1).

La Bartonella ha podido ser cultivada del Verrucoma por numerosos autores: por Herccelles (9) (1926) de verrucoma humano; por Noguchi (35) (36) (1926-27) de verrucoma humano y simiano; por Marquez da Cunha (43) (1928) de verrucoma simiano; por Aldana (18) (1929) de verrucoma humano; por Battistini (17) (1927) de verrucoma humano; por Kikuth (44) (1929) de verrucoma simiano; por Strong (41) (1937) de verrucoma humano; por Pinkerton y Weinman (38) (39) (1937) de verrucoma simiano y humano.

En cuanto a la forma de la Bartonella visible con el microscopio en el seno del tejido verrucoso las opiniones discrepan (Cuadro N° 2).

**Cuadro 1. Inoculación del Verrucoma**

<b>Autor</b>	<b>Donante</b>	<b>Receptor</b>	<b>Resultado</b>
Carrión (27), 1885	Hombre	Hombre	Fiebre Grave
Tamayo (28), 1899	Hombre	Perro	Verrucoma
Jadassohn y Seiffert (29), 1910	Hombre	Mono	Verrucoma
Jadassohn y Kolle (30), 1912	Hombre	Mono	Verrucoma
Strong (31), 1913; (32), 1945	Hombre	Hombre	Verrucoma
Mayer y col. (22), 1913	Hombre	Mono	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Conejo	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Conejo	Conejo	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Perro	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Mono	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Asno	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Cabra	Verrucoma
Arce y col. (33), 1913	Hombre	Carnero	Verrucoma
Monteverde (34), 1915	Hombre	Hombre	Verrucoma
Mackehenie y Weiss (23), 1926	Hombre	Mono	Verrucoma
Battistini (17), 1927	Hombre	Conejo	Verrucoma
Noguchi (35), 1927	Mono	Mono	Verrucoma
Noguchi (36), 1927	Hombre	Mono	Verrucoma
Mayer y Kikuth (37), 1927	Hombre	Mono (Esplenec.)	Verrucoma
Mayer y Kikuth (37), 1927	Hombre	Mono (Esplenec.)	Fiebre Grave
Aldana (18), 1929	Mono	Conejo	Verrucoma
Pinkerton y Weinman (38), (39) 1937	Hombre	Mono	Verrucoma
Strong y col. (41), 1937	Hombre	Mono	Verrucoma

**Cuadro 2. Forma de la Bartonella que ha podido ser vista en las células del Verrucoma**

<b>Autor</b>	<b>Forma bacteriana y cantidad</b>	<b>Inclusiones clamidozoarias</b>	<b>Animal</b>
Mayer y col. (22), 1913	No	Si	Hombre y mono
Mackehenie y Weiss (23), 1925	Si (muy escasas)	No	Hombre y mono
Noguchi (35) (36) (42), 1926-27	Si (abundante)	No	Mono
Marquez da Cunha (43), 1928	Si (escasa)	Si	Mono
Weiss (45), 1932	Si (escasa)	Si	Hombre
Pinkerton y Weinman (39) (40), 1937	Si (abundante)	Si	Hombre y mono
Urteaga (46), 1948	No	Si	Hombre
Alzamora Castro (1), 1945	Si (abundante)	No	Hombre
Urteaga (47), 1965	Si (no precisable)	No	Hombre

Nosotros no hemos logrado identificar la Bartonella, sea la forma bacteriana o la de cuerpos de inclusión en secciones de verrucomas coloreados con hematoxilina-eosina. Nuestras observaciones con otras técnicas de coloración (Regaud-Giemsa) se encuentran en ejecución; también buscamos la Bartonella en células desprendidas del verrucoma por tripsinización; estas células son coloreadas directamente con Giemsa o previamente cultivadas.

La morfología de la Bartonella en los tejidos varía con los autores; Noguchi (35) (36) (42) en verrucomas del mono muestra típicas y muy abundante formas bacterianas; Alzamora Castro (1) en verrucomas humanos en forma semejante y Urteaga (47) totalmente diferente. Aldana (48) no acepta la presencia de la forma bacteriana en las células del verrucoma sino solamente la de cuerpo de inclusión clamidozoica.

Pinkerton y Weinman (39) (40) encuentran formas bacterianas en unas células y formas de inclusiones clamidozoarias en otras; no se atreven a pronunciarse sobre si las inclusiones corresponde a masas de gérmenes degenerados o si ellos representan estadios en el ciclo vital de la Bartonella. Márquez da Cunha (43) y Weiss (45) encuentran coexistencia de las formas bacterianas y de inclusión dentro de las mismas células. Urteaga describía en 1948 (46) "típicas inclusiones citoplasmáticas de Mayer, Rocha Lima y Werner" sumándose a la teoría de Aldana (48) de que ellos representan la forma de virus de la Bartonella; en 1965 describe solamente formas bacterianas (47).

En nuestra opinión las formas bacterianas y de inclusión clamidozoica corresponderían a estadios evolutivos de la Bartonella. El destino de la Bartonella en el tejido verrucoso así como el de éste que la alberga es la involución y su desaparición. Las inclusiones clamidozoarias corresponderían a las etapas finales del proceso degenerativo o de digestión intracelular del germen. Observaciones seriadas en cultivo de tejidos podrían dilucidar el problema, asunto en el cual estamos empeñados, representando el presente trabajo un primer intento. El germen ha mostrado hábitos de multiplicación dentro de células, de tejidos humanos (1) (31) (32) (35) (48), de animales de experimentación incluyendo el embrión de gallina (49) y de cultivo de tejidos (38).

La identidad del germen aislado de botones verrucosos con el de la Fiebre Grave de Carrión ha sido probada por múltiples procedimientos: a) Por pruebas de inoculación (Germen de la Fiebre Grave que por inoculación determina Fiebre Grave o Erupción verrucosa; germen

de la erupción verrucosa que por inoculación determina Fiebre Grave o nódulos verrucosos). En el caso de Carrión (27) por inoculación con material de nódulo verrucoso ocurrió Fiebre Grave mortal; en García Rosell (50) por autoinoculación accidental con sangre parasitada de Fiebre Grave se produjo erupción verrucosa; Kuczynski Godard (24) se autoinoculó con cultivo de Bartonella proveniente de un caso de Fiebre Grave resultando con erupción verrucosa generalizada. Numerosas experiencias de inoculación (35) (36) (39) (40) (50) (51) (52), además las referencias dadas en el Cuadro I, prueban que la Fiebre Grave y la Verruga Peruana son producidas por un mismo agente etiológico. b) Por los caracteres culturales y morfológicos de la Bartonella aislada de uno u otro síndrome (35) (38) (39) (40) (50) (53). c) Por la inmunidad cruzada (Erupción verrucosa contra Fiebre Grave y viceversa) (54). d) Por la igual distribución geográfica (55), con la salvedad de que hay zonas con preponderancia de la forma eruptiva y zonas con la de la forma anemizante.

Hercelles primero en 1935 (56) y Urteaga después en 1965 (47) describen la presencia de la forma bacteriana de la Bartonella en secciones de piel aparentemente normal de pacientes en períodos intercalar (Preeruptivo). Creemos que lo que Urteaga describe como células adventiciales cargadas de Bartonellas corresponden a la "capillaritis trombosante" descrita por Hercelles, con la reserva de que todavía son necesarios efectuar estudios de inmunofluorescencia para saber si se trata o no de Bartonellas, pues el organismo del verrucoso es muy receptivo para gérmenes de infección secundaria (57) y los verrucomas dérmicos frecuentemente se encuentran contaminados (17) (18) (21) (58) (59). Noguchi (60) ha podido aislar de verrucomas humanos una bacteria contaminante o asociada a la Bartonella (*Bacterium peruvianum*) con marcada capacidad patogénica para los animales de laboratorio.

Debemos manifestar finalmente que nuestro múltiple esfuerzo por localizar a la Bartonella en el tejido verrucoso ha resultado infructuoso, nuestro propósito de encontrar una explicación razonable nos ha llevado a hacer una revisión de la etiopatogenia del verrucoma. Hemos de creer que la negatividad se debe a que el tejido verrucoso con el que trabajamos ya no contenía elementos viables; tal vez inoculaciones en animales, que no hemos hecho, habrían podido demostrar al agente etiológico.

## SUMARIO

Ha sido obtenida "in vitro" la multiplicación de las células del Verrucoma. No pudo ser localizada la Bartonella bacilliformis, ni ningún otro germen, en los cultivos (microscopía y cultivos); ni pudo ser aislada del paciente mediante hemocultivo y cultivo de fragmentos de verrucoma.

## BIBLIOGRAFIA

1. Alzamora Castro V. Contribución al estudio de la Bartonellosis Humana o Enfermedad de Carrión. *Gaceta Med. Lima*, 2, 78-89, 1945.
2. Earle, W. R. Production of Malignancy in Vitro. IV. The Mouse Fibroblast Cultures and Changes seen in the Living Cells. *J. Nat. Cancer Inst.*, 4, 165-212, 1943. (Citado por 3 en *Diagnostic Procedures for Virus...*).
3. Melnick, J. L. Tissue Culture Methods for the Cultivation of Poliomyelitis and other Viruses. *Diagnostic Procedures for Virus and Rickettsial Diseases* (Second. ed., T. J. Francis, Jr., Ed.). New York, American Public Health Association, 1965, pp. 97-152.
4. Rous, P., and Jones, F. S., A method for obtaining suspensions of living cells from the fixed tissues, and for the plating out of individual cells. *J. Exper. Med.*, 23, 549-555, 1916.
5. Dulbecco, R., and Vogt, M. Plaque formation and isolation of Pure Lines with Poliomyelitis Viruses. *J. Exper. Med.*, 99, 167-182, 1954.
6. Zwiling, E. Dissociation of Chick Embryo Cells by means of a Chelating Compound. *Science*, 120, 219-219, 1954.
7. Madin, S. H., and Darby, N. B., Jr. Established Kidney Cells Lines of normal adult bovine and ovine origin. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 98, 574-576, 1958.
8. Schmidt, N. J. Tissue Culture Methods and Procedures for Diagnostic Virology (pp. 49), 78-176. *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Diseases*. Third Edition. American Public Health Organization, 1964.
9. Herculles O. El germen de la Verruga Peruana. *Anales Fac. Med. Lima*, 9, 231-264, 1926.
10. Harrison, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 4, 140, 1907. (Citado por Parker, Nº 14).
11. Burrows, M. T. The cultivation of tissues of the chick embryo outside the Body. *J.A.M.A.*, 55, 2057-1910 (Citado por Parker, Nº 14).
12. Gey, G. O. An improved technic for massive tissue culture. *Am. J. Cancer*, 17, 152, 1933 (Citado por Parker, Nº 14).
13. Gey, G. O., and Gey, M. K. The maintenance of human normal cells and tumor cells in continuous culture. I. Preliminary report: Cul-

- tivation of mesoblastic tumors and normal tissue and notes on methods of cultivation. *Am. J. Cancer*, 27, 45, 1936 (Citado por Parker, N° 14).
14. Parker, R. G. *Methods of Tissue Culture*. Third Edition. Paul B. Hoeber, Inc. Medical Division of Herper & Brothers, 1961.
  16. Melnick, J. L., and Riordan, J. T. Poliomyelitis viruses in Tissue Cultures. IV. Protein-free nutrient media in Stationary and Roller-tube cultures. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 81, 208-213, 1952.
  16. Moran, G. L., and Melnick, J. L. Poliomyelitis virus in Tissue Culture. VI. Use of Kidney epithelium grown on glass. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 84, 558-563, 1953.
  17. Battistini T. Contribución al estudio de la Verruga Peruana. Cultivo de la Bartonella bacilliformis. *An. Fac. Med. Lima*, 10, 243-352, 1927.
  18. Aldana L. Bacteriología de la Enfermedad de Carrión. *Cron. Med. Lima*, 46, 235-285, 1929.
  19. Fischer, A. Gewebezüchtung. R. Muller, München, 1927 (Citado por Alzamora Castro, N° 1).
  20. Biscegli, V. und Juhasz-Schaffer, A. Die Gewebezüchtung in vitro. J. Springer, Berlin, 1928. (Citado por Alzamora Castro, N° 1).
  21. Letulle M. Histologie Pathologique des Verrugas Cutanéas (Págs. 201-210). En Odriozola E. La Maladie de Carrion ou la Verruga Péruvienne. Paris, Georges Carré et C. Naud, Editeurs 3, Rue Racime, 3, 1898.
  22. Mayer, M., Rocha Lima, H. und Werner, H. Untersuchungen über Verruga peruviana. *Muench. Med. Wochenschrift*, 10, 1913. *Cron. Med. Lima*, 30, 193-197, 1913 (Traducción del alemán).
  23. Mackehenie D. y Weiss P. Contribución al estudio de la Verruga Peruana. *Rev. Soc. Med. U. F. y C. E. M.*, 1925. *Gaceta Médica Peruana* IV, 18, 1926.
  24. Mackehenie D. Un caso de Verruga humana por autoinoculación experimental. *La Reforma Médica*, Lima, 23, 741-744, 1937.
  25. Mackehenie D. Estudio del noduloma verrucoso. *La Reforma Médica*, Lima, 24, 50-53, 1938.
  26. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. II. Viability of Bartonella bacilliformis in cultures and in the preserved blood and excised nodule of Macacus rehsus. *J. Exper. Med.*, 44, 533-538, 1926.
  27. Medina C., Mestanza E., Arce J., Alcedán M., Miranda R. y Montero M. La Verruga Peruana y Daniel A. Carrión. *Anal. Fac. Med. Lima* (vol. extraordinario), 1-54, 1925.
  28. Tamayo M. O. Inoculabilidad de la Verruga. *Cron. Med. Lima*, 16, 81-84, 1899.
  29. Jadassohn y Seiffert. Uber eine Fall von Verruga peruviana; gelungene übertragung auf Affen. *Zeitschrift f. Hyg. u. Infektionskr.* 66, 247, 1910 (Citado por Rebagliatti, N° 55).
  30. Jadassohn y Kolle (Citado por Rebagliatti, N° 55).
  31. Strong, R. P., Tyzzer, E., Brues, G. T., Sellards, A. W., y Gastiaburú, J. Informe preliminar de la primera expedición del Departamen-

- to de Medicina Tropical de la Universidad de Harvard a Sudamérica. *Cron. Med. Lima*, 31, 2-12 1914.
32. Strong, R. P. *Stitts's Diagnosis, Prevention and Treatment of Tropical Diseases*. Seventh Edition. The Blakiston Company, Philadelphia, 1945.
  33. Arce J., Mackehenie D. y Ribeyro D. Estudio experimental de la Enfermedad de Carrión. I. Inoculabilidad de la Verruga Peruana a los animales. *Cron. Med. Lima*, 30, 394-397, 1913.
  34. Monteverde J. A. (Citado por Rebaglatti, Nº 55, pág. 42).
  35. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. III. The behavior of *Bartonella bacilliformis* in *Macacus rehsus*. *J. Exper. Med.*, 44, 697-714, 1926.
  36. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. IV. The effect of Inoculation of Anthropoid Apes with *Bartonella bacilliformis*. *J. Exper. Med.*, 44, 715-728, 1926.
  37. Mayer M., Borchard, & Kikuth, W. *Klin. Wochenschr.*, 555, 1926. *Arch. f. Schiffs u. Tropen. Hyg.*, 31, 925, 1927 (Citado por Strong, Nº 32).
  38. Pinkerton, H. and Weinman, D. Carrion's Disease. I. Behavior of the Etiological Agent within cells growing or surviving in vitro. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 37, 587-590, 1937.
  39. Pinkerton, H. and Weinman, D. Carrion's Disease. II. Comparative morphology of the Etiological Agent in Oroya Fever and Verruga Peruana. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 37, 591-593, 1937.
  40. Pinkerton, H. and Weinman, D. Carrion's Disease. III. Experimental Production in animals. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 37, 594-595, 1937.
  41. Strong R. P., Pinkerton H., Weinman D., Hertig M. y Benett B. Investigación sobre la severa forma de anemia infecciosa en la Enfermedad de Carrión y su estado eruptivo, verrugas. Su método de transmisión (Nota preliminar del trabajo de la Expedición de la Universidad de Harvard en el Perú, en 1937). *Act. Med. Per. Lima.*, 2, 441-442, 1937.
  42. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. VI. Pathological changes observed in animals experimentally infected with *Bartonella bacilliformis*. The distribution of the Parasites in the Tissues. *J. Exper. Med.*, 45, 437-454, 1927.
  43. Marques da Cunha A. e Muñoz J. Pesquisas sobre la Verruga Peruana. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 21, 161-166, 1928.
  44. Kikuth, W. Ein neuer Anamieerreger. *Zentralbl. f. Bakt.*, 113, 1929 (Citado por Strong, Nº 32). *Experiments on Oroya Fever and Verruga Peruana. Zeitschr. f. Immunitätsf. a Experim. Therap.*, 73, 1, 1931. *Ergeb. der Hyg. Bakt. Immunitätsf. und exp. Therapie*, 31, 559, 1932.
  45. Weiss P. Contribución al estudio de la Verruga Peruana o Enfermedad de Carrión. *Rev. Med. Per. Lima*, 4, 5-25, 58-66, 1932.
  46. Urteaga O. Histopatogenia de la Anemia en la Verruga Peruana *Arch. Per. Patol. Clin.*, Lima, 2, 355-387, 1948.
  47. Urteaga O. y Calderón M. J. Ciclo biológico de reproducción de la

- Bartonella bacilliformis* en los tejidos de pacientes de Verruga Peruana o Enfermedad de Carrión. Arch. Per. Patol. Clin., Lima, 19, 1-84, 1965.
48. Aldana L. Estados biológicos de la *Bartonella* en la Enfermedad de Carrión. Rev. Sanid. Polic. Lima, 7, 391-499, 1947.
  49. Jiménez, J. F. and Buddingh G. J. Carrion's Disease. II. Behavior of *Bartonella bacilliformis* in Developing Chick Embryo. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 45, 546-551, 1940.
  50. Noguchi, H. and Battistini, T. Etiology of Oroya Fever. I. Cultivation of *Bartonella bacilliformis*. J. Exper. Med. 43, 851-821, 1926.
  51. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. VII. The response of the skin of *Macacus rhesus* and Anthropoid Apes to Inoculation with *Bartonella bacilliformis*. J. Exper. Med., 45, 455-463, 1927.
  52. Noguchi, H. The etiology of Verruga Peruana. J. Exper. Med., 45, 175-189, 1927.
  53. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. X. Comparative studies of different strains of *Bartonella bacilliformis*, with special reference to the relationship between the clinical types of Carrion's disease and the virulence of the infecting organism. J. Exper. Med., 47, 219-233, 1928.
  54. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. VII. Experiments on Cross-Immunity between Oroya Fever and Verruga Peruana. J. Exper. Med., 45, 781-786, 1927.
  55. Rebagliati R. Verruga Peruana (Enfermedad de Carrión). Imprenta Torres Aguirre, Lima, 1940.
  56. Herculles O. La *Bartonella* en el hipodermis y de un modo general en el mesénquima de nuestros órganos y tejidos. Rev. Med. Per. Lima, 7, 615-621, 1935.
  57. Cuadra M. Las infecciones secundarias en la Verruga Peruana. Rev. Med. Per. Lima, 28, 748-769, 1957.
  58. Biffi U. y Carbajal G. Sobre un caso de Enfermedad de Carrión con verrucomas supurados. Cron. Med. Lima, 21, 285-295, 1904.
  59. Tamayo M. O. y Gastiaturú J. C. Un nuevo caso de Verruga con nodulomas supurados. Gac. de los Hosp. Lima, 3, 107-112, 1905-06.
  60. Noguchi, H. Etiology of Oroya Fever. IX. *Bacterium peruvianum*, N. Sp., A secondary invader of the lesions of Verruga peruana. J. Exper. Med., 47, 165-170, 1928.

**Agradecimiento.** A los Drs. Romeo Zelada y César Jordán por las facilidades que nos brindaron en la Sala San Vicente del Hospital Dos de Mayo; al Dr. Ernesto Rivas por la extirpación de los verrucomas; y a la Srta. Carmen La Torre Luna, asistente del Laboratorio de Virología, por la preparación de los medios de cultivo de tejidos.