

## Tesis de Posgrado

# Estudio bacteriológico y microquímico de la sangre obtenida de los focos hiper-hémicos estrangulados tuberculosos

Tessieri, Iris

1932

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Tessieri, Iris. (1932). Estudio bacteriológico y microquímico de la sangre obtenida de los focos hiper-hémicos estrangulados tuberculosos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0177\\_Tessieri.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0177_Tessieri.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Tessieri, Iris. "Estudio bacteriológico y microquímico de la sangre obtenida de los focos hiper-hémicos estrangulados tuberculosos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1932.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_0177\\_Tessieri.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_0177_Tessieri.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

"ESTUDIO BACTERIOLÓGICO Y MICROQUÍMICO DE LA SANGRE OBTENIDA  
DE LOS FOCOS HIPERÉMICOS ESTRANGULADOS TUBERCULOSOS".-

Por la Doctora

IRIS TESSIERI



BUENOS AIRES

1.932

"ESTUDIO BACTERIOLOGICO Y MICROQUIMICO DE LA SANGRE OBTENIDA DE LOS FOCOS HIPER-HEMICOS ESTRANGULADOS TUBERCULOSOS"

Por la Doctora Iris Tessieri

---oo0oo---

Iniciamos con este trabajo el estudio bacteriológico y micro-químico de la sangre que se extrae de los focos hiper-hémicos tuberculosos o focos estrangulados de Robertson Lavalle.

La literatura científica relacionada con esta investigación es sumamente escasa en lo que se refiere al estudio micro-químico, siendo nula la referente a la parte bacteriológica y citológica.

Von Lignas ya en su trabajo, cita al respecto los elementos derivados de la desintegración de la hemoglobina que pueden hallarse en estos focos que, como veremos más adelante, son especialmente la hematoidina y la hemosiderina.

Antes de seguir adelante haremos una breve reseña, transcribiendo, con este fin, el siguiente resumen extractado de una publicación del profesor Carlos Robertson Lavalle, y en el que dice:

"Mis estudios desde el año 1912 han demostrado que en toda osteo-artritis tuberculosa existe generalmen-

"te uno por lo menos, muy pocas veces dos o más, focos  
"tuberculosos, con éxtasis venosa, anfixia ósea, estran-  
"gulamiento, lleno de sangre con la hemoglobina trans-  
"formada y repletos de bacilos de Koch de forma corpus-  
"cular (corpúscular de Koch), ácido resistentes.

"El foco tuberculoso estrangulado es en gene-  
"ral muy pequeño, de uno a dos centímetros; lo más fre-  
"cuentemente está situado en un punto circunscripto den-  
"tro de la zona hiper-hémica o vinosa de Taignot, sin  
"estrangulamiento y en una de las epífisis que forman  
"la articulación. A veces está lejos de la zona hiper-  
"hémica, próximo o alejado de los focos cavernosos o  
"en la diáfisis, como sucede sobre todo en las coxal-  
"gias de muchos años de evolución, en las cuales el pro-  
"ceso tuberculoso, empezado en la cabeza femoral, se ha  
"ido corriendo hacia el cuello del fémur y hasta la ex-  
"tremidad superior del canal medular diafisario, a me-  
"dida que el organismo, espontáneamente, cicatriza  
"las lesiones más próximas a la articulación.

"El foco estrangulado es de reducidas dimensio-  
"nes en la rodilla. En la coxalgia, si es femoral, está  
"en la cabeza, cuando toda su extensión y si es aceta-  
"bular, ocupa puntos circunscriptos en una de las tres  
"porciones de la acetabular. En los cuerpos vertebrales

"es también de gran extensión y ocupa sobre todo la por-  
"ción posterior del cuerpo, es decir, la vecina al canal  
"vertebral y base del pedículo articular, cuando la vér-  
"tebra no está toda entera caseosa.-

"Mi anatomía patológica no era tan simplista  
"cuando comencé a estudiar esta especialidad, para desco-  
"nocer todas las variedades de formas y lesiones que la  
"tuberculosis produce, pero agregé a las descripciones  
"generales el convencimiento nacido ya en el año 1912,  
"cuando reconocaba el fisis en las tuberculosis óseas, de  
"que existía en ellas un foco equimótico tuberculoso, cir-  
"cunscripto por una barrera de tejido embrionario, foco  
"no evolutivo y aún no descripto en la bibliografía mun-  
"dial.-

"Este foco contiene sangre negra y espesa como  
"alquitrán, con la hemoglobina transformada en hematoí-  
"dina hematina, con células de hemosiderina y repleta de  
"bacilos de Koch, forma corpuscular, ácido resistentes  
"(corpúsculos de Koch). Focos que una vez perforados, la  
"sangre que de ellos seguía brotando era cada vez más ro-  
"ja y con hemoglobina normal, lo que así demostraba que  
"eran focos que antes habían estado estrangulados.-

"El foco, lo he constatado, persistiendo en sus  
"caracteres en enfermos tratados por la helioterapia y el

"repose, con radiografías sacadas a un año de diferencia  
"y en el cual, durante este lapso, las lesiones evoluti-  
"van a su alrededor y distancia, habían progresado, habiér-  
"dose establecido nuevas cavernas y focos caseosos, hallán-  
"dose la articulación aun más gravemente enferma.

"Radiográficamente, el foco estrangulado no pre-  
"senta siempre las mismas características; ésto posiblemente  
"depende de que esté más o menos profundamente situado  
"en el espesor del hueso y de que las porciones que lo en-  
"vuelven estén más o menos enfermas en los diversos momen-  
"tos del proceso tuberculoso.

"En general se puede decir, que lo que caracteri-  
"za al foco estrangulado, es la desaparición del grabado  
"normal del hueso, desde que las líneas ondulantes parale-  
"las con el cual las trabéculas óseas se manifiestan en  
"las buenas radiografías, han desaparecido, no por simple  
"reabsorción como en la atrofia ósea, sino por haber sido  
"reemplazada por una mancha más o menos circular contien-  
"do pequeños puntos o pequeñas masas de bordes bien nítidos  
"y que solamente cuando la éxtasis venosa es muy pro-  
"nunciada aparece sólo una mancha negra.

"El límite de este foco estrangulado no está mar-  
"cado como en las cavernas constituidas o en cambio de ser-  
"lo, ya que todas éstas presentan en toda su periferia o en

"parte de ella, un espesamiento del tejido óseo, que se  
" asemeja en las radiografías a tejido cortical muy del-  
"gado.

"El foco estrangulado se puede decir que se vá  
"atenuando hacia la periferia, donde su espesor es menor,  
"pero siempre su límite es bastante nítido.-

"Es claro, que como todos los fenómenos biológi-  
"cos, es en unos enfermos, más acentuado que en otros, pero  
"que conociendo casos típicos, como son los que muestran  
"las radiografías ya conocidas, fácil será buscarlo en ra-  
"diografías de otros pacientes. Siempre en el interior de  
"los focos estrangulados tuberculosos, encontramos radio-  
"gráficamente, múltiples puntos o pequeñas manchas, con lími-  
"tes perfectamente nítidos, bien delineados, separados unos  
"de otros. Ahora bien, como lo que caracteriza a la tuber-  
"culosis en marcha invanescente, es que las manchas o tractus  
"son anastomosados y con sus bordes nebulosos floconosos que  
"se van apagando y dispersando en su periferia, tenemos que  
"concluir sosteniendo que, en el interior del foco estrangu-  
"lado, la tuberculosis está detenida en su marcha, dada la  
"calidad de las manchas que lo llenan y la situación corpus-  
"cular y, por lo tanto atenuada, de los bacilos de Koch, allí  
"existentes. Para nosotros los focos estrangulados son enton-  
"ces vertores de antígenos débiles, es decir de autovacunas

"que permiten que la tuberculosis tenga en el sujeto,  
"una marcha prolongada, puesto que en mis estudios he  
"constatado que cuando estos focos estrangulados des-  
"parecen, el enfermo muere a los pocos días."

En nuestro trabajo nos propusimos estudiar desde el punto de vista bacteriológico y microquímico la sangre extraída de estas zonas, cuyas características radiológicas y anátomo-patológicas, acabamos de indicar.

Con este fin utilizamos la sangre que queda en libertad al perforar los focos activos, hecho éste que tiene lugar cuando se practica la intervención quirúrgica de Robertson Lavalle.- Al perforar estos focos activos se la ve salir, con cierta presión, a manera de tapón, siendo de aspecto denso, color negruzco, que pronto se ve arrastrada por la sangre que baña o brota de la región intervenida.-

En estas ocasiones pudimos observar una sangre cuyos caracteres macroscópicos difieren de los propios de una sangre normal.-

Dicha sangre tiene el aspecto de la sangre mal oxigenada, presentando un color rojo-negruzco. A simple vista se observa que su densidad es mayor que la de la normal. Tiene además la característica que, al ser extraída, coagula muy rápidamente.-



## TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE LA SANGRE

Hemos tenido ocasión de extraer la sangre en todos los casos intervenidos en el Servicio del Prof. Robertson Lavalle, durante el transcurso de los años 1929, 1930 y 1931.-

Las distintas afecciones óseas intervenidas comprendieron: 1ª) Coxalgias; 2ª) Mal de Pott; y 3ª) Ósteo-artritis de rodilla, de cuello de pié y algunas espino-ventosas.-

Para la extracción de la sangre hemos tenido en cuenta la distinta situación de los focos hiperémicos estrangulados tuberculosos, en cada una de las afecciones arriba indicadas.-

En las coxalgias: Encontramos focos hiperémicos estrangulados tuberculosos en mayor cantidad; por ende la cantidad de sangre es mayor; además estos son focos fácilmente accesibles durante el acto operatorio.

Mal de Pott: En estos casos, el foco hiperémico estrangulado tuberculoso, está formado generalmente por todo el cuerpo vertebral, estos focos son difícilmente accesibles durante el acto operatorio.-

Ósteo-artritis de rodilla: En esta afección, nos encontramos con focos pequeños y profundos. Durante el acto operatorio se llega a ellos mediante una técnica muy difícil

Teniendo en cuenta las características y ubicación de focos, la extracción de la sangre a estudiar, se hizo en la siguiente forma:

Coxalgias: Es suficiente recibir directamente sobre el tubo de ensayo, la sangre que gotea del túnel efectuado para perforar el foco estrangulado. Con facilidad, así obtuvimos sangre en buen estado de pureza.

Ósteo-artritis de rodilla; Mal de Pott; Ósteo-artritis de cuello de pié, de muñeca, etc.- En estos casos utilizamos el siguiente dispositivo: Hicimos uso de un trocart de dos a tres milímetros de diámetro, al que se le adaptó una jeringa.-

En el preciso instante que se efectúa la perforación de la superficie del foco hiperémico, introducimos el trocart en el túnel de perforación, aspirando inmediatamente, la sangre queda en libertad.

Como se ve el trocart tiene como fundamento, obtener directamente sangre estrangulada, evitando en lo posible la dilución de esta sangre densa y negraza con la normal que gotea del túnel. Recolectamos, según los casos, sangre coagulada o bien sangre citratada. Esta última la obtuvimos mezclando la sangre obtenida con una solución de citrato de sodio al 10%, en una proporción de 2 cc. de esta solución por cada 10 cc. de sangre a extraer, agitando luego

inmediatamente, para evitar la coagulación.

### EXAMEN BACTERIOLÓGICO

En la sangre extraída en la forma que acabamos de indicar, investigamos únicamente, la presencia del bacilo de Koch.-

El bacilo tuberculoso se puso en evidencia: 1º) mediante métodos directos; 2º) mediante pruebas de identificación.-

Los métodos directos empleados fueron: 1º) Coloraciones directas de la sangre ya sea centrifugada o coagulada; 2º) Coloraciones de la sangre, previamente homogeneizada, con el fin de aumentar así la cantidad de gérmenes que se desean poner en evidencia.-

Las pruebas de identificación del bacilo de Koch utilizadas, fueron: 1º) Diferenciación mediante la inoculación de la sangre; 2º) Diferenciación mediante cultivos de la misma.

La inoculación de la sangre se hizo en cobayos, en la forma que más adelante detallaremos.

### EXAMEN DIRECTO

Partiendo de la base de que, una sangre de foco estrangulado, bien extraída, y con el fin de estudiar las características con que estos gérmenes se presentan, debe ser rica en bacilos de Koch, nos propusimos efectuar en la misma, un examen directo; es decir, efectuamos coloracio-

nes de la sangre, sin someterla a un tratamiento previo. Con este fin tuvimos en cuenta los siguientes métodos:

#### MÉTODO DE SABATHE & DUGUET

Está basado, en que si dejamos coagular una sangre que contiene bacilos tuberculosos, éstos se hallarán en la zona de separación del coágulo y del suero. En los casos de coágulos fibrinosos, éstos se hallan especialmente en la región rica en fibrina.

Técnica: 1<sup>º</sup>) Extraer sangre en la forma indicada, en un tubo de ensayo estrangulado en su parte superior; 2<sup>º</sup>) Dejar coagular la sangre a una temperatura de 25<sup>º</sup>; 3<sup>º</sup>) Separar el suero teniendo mucho cuidado de no tocar la parte superior del coágulo; 4<sup>º</sup>) Extraer una pequeña porción de la parte superior de dicho coágulo, prefiriendo la zona fibrinosa, en el caso de que esta se halle; 5<sup>º</sup>) Hacer extensiones, fijar, colorearlas por métodos que más adelante se detallarán.

#### MÉTODO CON SANGRE CITRATADA

Basado en el mismo fundamento que el anterior.

Técnica: 1<sup>º</sup>) Extraer sangre citratada; 2<sup>º</sup>) Centrifugarla; 3<sup>º</sup>) Decantarla cuidadosamente, evitando arrastrar partículas de la parte superior del sedimento; 4<sup>º</sup>) Extraer una pequeña porción de la parte superior del sedimento; 5<sup>º</sup>) Efectuar extensiones, fijarlas y colorearlas.

En los casos en que obtuvimos sangre coagulada

empleamos la técnica de Sabathe y Duguet; siguiendo el segundo método en los casos en que la sangre extraída fué citratada.

Para las coloraciones de los frotis, obtenidos en la forma que se acaba de indicar, hemos tenido en cuenta las distintas técnicas de coloraciones de bacilos de Koch que a continuación se indican:

#### -COLORACION DEL BACILO DE KOCH-

Sabemos que el bacilo tuberculoso posee características tioriales que se utilizan principalmente para llegarlos a distinguir de los demás microbios.

El primer método de coloración fué el de Koch, quien viendo que le era imposible poner en evidencia el agente de la tuberculosis, utilizando los procedimientos ordinarios, se valió entonces de técnicas distintas. Para esto utilizó un líquido colorante que poseía la siguiente constitución: solución alcohólica concentrada de azul de metileno: 1 cc. (de agua destilada para esa cantidad, 200 cc.), KOH al 10%, 0.2 cc. Las preparaciones se coloreaban con este líquido durante veinticuatro horas; luego se les agregaba una solución acuosa de vesulina, coloreándose las hasta coloración morena intensa. En esta forma

los bacilos de Koch aparecían con un color azul intenso sobre un fondo moreno intenso. Este método tiene solamente un interés histórico.

Ehrlich, al poco tiempo, lo modificó en la siguiente forma: utilizó una solución alcohólica de fucsina o de violeta de metilo en agua de anilina. Reparaba este colorante vertiendo gota a gota la solución de anilina al 5% sobre la solución saturada de fucsina o de violeta de metilo, hasta lograr una ligera opalescencia. Weigut, indicó luego las proporciones en que debían mezclarse estos líquidos, siendo la siguiente: solución saturada de fucsina o de violeta de metilo: 11 cc.; agua de anilina: 100 cc. Esta mezcla había que filtrarla cada vez; y esto se evitaba añadiendo al colorante 10 cc. de alcohol absoluto. En estas condiciones el baño colorante podía durar diez días.

Por la técnica primitiva, la coloración se hacía en frío, durante quince o treinta minutos; en ciertos casos se prolongaba durante horas. Esto hacía que no en todos los casos se colorearan los bacilos; por esta razón, Rindfleisch fué el primero que obtuvo muy buenos resultados coloreando en caliente durante unos pocos minutos.

En la decoloración se utiliza ácido nítrico al 1/3 según consejo de Ehrlich y alcohol a 60° propuesto por Koch. El lavado y recoloración se hizo como se hace actualmente.

Este método como se ve es el origen del de Ziehl-Nielsen, que es el que hoy usamos con más frecuencia y en ciertos casos con algunas modificaciones.

La técnica de Ehrlich se diferencia de la que se usa corrientemente en que en lugar del líquido de Ehrlich se usa el de Ziehl.

El inconveniente del método de Ehrlich, estriba en que el baño colorante no se conserva debido al agua de anilina que utiliza. Más tarde Ziehl halló un líquido que se conserva indefinidamente, substituyendo la solución de anilina por una solución de ácido fénico. En las primeras pruebas se utilizó una solución saturada de ácido fénico, adicionada al 2% de una solución alcohólica de violeta de metilo. Luego Nielsen modifica el procedimiento, dando a conocer el método de Ziehl-Nielsen, que es el que actualmente usamos, en algunos casos con ciertas modificaciones.

La coloración del bacilo de Koch, mediante este método, está basada: 1° en la coloración del bacilo por la fucsina fenicada de Ziehl en caliente hasta des-

prendimiento de vapores; 2<sup>o</sup>) En la decoloración, mediante ácido sulfúrico al 1/4 o ácido nítrico al 1/3 y alcohol a 60; 3<sup>o</sup>) En la recoloración del preparado mediante una solución débil de azul de metileno.

El éxito de la coloración, utilizando este método, depende del modo de preparar el líquido de Ziehl. Si éste no está bien preparado, no actúa como mordiente y el bacilo no se colorea o lo hace débilmente, no resistiendo así a la acción de los decolorantes y dando por lo tanto lugar a errores en los resultados. Es por esto necesario: 1<sup>o</sup>) Preparar el baño colorante, siguiendo estrictamente la fórmula de preparación; 2<sup>o</sup>) Probar el colorante con preparaciones que sepamos de antemano que contienen abundantes bacilos de Koch.

#### PREPARACIÓN DE LA FUCSINA DE ZIEHL

Fucsina rubina.....1 gr.  
Alcohol absoluto.....10 cc.  
Acido fénico puro crist..5 gr.  
Agua destilada.....100 cc.

Machacar en un mortero la fucsina con 10 cc. de alcohol absoluto; añadir ácido fénico y agregar luego, en pequeñas porciones, y removiendo siempre, 60 cc. de agua destilada. Viértase todo en un frasco y con los 40 cc. de agua restantes, lavar bien el mortero; dejar reposar 24



horas y luego filtrar.

En esta fórmula, en lugar de fucsina, puede emplearse violeta de geniana fenicada; en este caso la recoloración se hará con colorantes pardos o amarillos.

#### METODO DE FRANKEL

Con este método la decoloración y la recoloración del bacilo de Koch se hace a un tiempo.

Técnica: Una vez coloreada la preparación por la fucsina, ya sea siguiendo el método de Ziehl o de Ehrlich, se la somete durante dos minutos a la acción de la siguiente mezcla:

Alcohol..... 50 cc.

Agua..... 30 cc.

Acido nítrico..... 20 cc.

Azul de metileno en exceso.

(Agitar y filtrar).

En el caso de que los bacilos hayan sido coloreados con violeta de metilo, el azul de metileno se reemplaza por vesulina.

#### METODO DE GABBET

Basado en el mismo fundamento que el anterior.

Técnica: Después de la coloración por la fuc-

sina de Ziehl, efectuada durante veinte o más minutos, agregar la siguiente mezcla:

Acido sulfúrico.....25 cc.--  
Agua.....100 "  
Azul de metileno.....1 a 2 grs.--

Estos procedimientos no son recomendables, pues no nos permiten apreciar el grado de decoloración de la preparación. Igual inconveniente tendría el procedimiento de Gibbes, quien en un solo tiempo colorea el bacilo de Koch. Para esto utiliza la siguiente fórmula

Fuchsina.....2 grs.-  
Azul de metileno.....1 grs.-  
Alcohol absoluto.....15cc.-  
Anilina.....3 cc.-  
Agua destilada.....150 cc.-

#### METODO DE SPENGLER

(Deutsche Med. Woch. 1907. 33 pág. 337.-) Este método está basado: 1ª) en la coloración del bacilo de Koch mediante la fuchsina fenicada Ziehl en caliente; 2ª) Se deja actuar durante tres o cuatro minutos la siguiente mezcla (partes iguales de una solución saturada de ácido pícrico y alcohol absoluto); 3ª) Se lava con alcohol a 60°; 4ª) Se hace actuar durante veinte segundos, ácido nítrico al 15% y se termina la decoloración con alcohol.- 5ª) Se lava con agua; 6ª) Se hace la coloración de fondo con una solución hidro-alcohólica de ácido pícrico.- Mediante este método los bacilos aparecen

teñidos en rojo sobre un fondo amarillo.-

### METODO DE BLANCO

Consiste en lo siguiente:

1º) Colorear en caliente hasta desprendimiento de vapores, utilizando la fuchsina de Ziehl durante cinco minutos; 2º) Decolorar con alcohol clorhídrico al 3% durante medio minuto (término medio); 3º) Diferenciar durante diez minutos con una solución de Orange I.- Esta se prepara con un centímetro cúbico de solución saturada acuosa más noventa y nueve de agua. Teñir el fondo de la preparación. Generalmente se hace con la mitad de preparado por solución débil de azul de metileno.-

### METODO DE BIOT

1º) El producto a examinar se extiende en capa muy delgada; 2º) Se hace una coloración con fuchsina de Ziehl en caliente, durante dos o tres minutos; 3º) Sin lavar se colorea con ácido nítrico a 1/4, luego con alcohol a 70º, intensificando la decoloración; 4º) Se hace actuar durante tres o más minutos formal al 40%; 5º) Se lava bien, se seca la preparación y se observa. Como se vé, en este método, no se emplea la coloración de contrastes; de este modo los bacilos resaltan con un color violeta intenso sobre el fondo de la preparación

no coloreada. Mediante este método se obtienen mejores resultados que con el de Ziehl-Nielsen, consiguiéndose ver mayor número de bacilos.

#### METODO DE FERRET

Con este método se colorean los bacilos de Koch siguiendo la técnica de Biot, con la diferencia de que se hace una coloración de fondo con eosina, con el fin de facilitar así la observación microscópica.

Ferret, siguiendo a Kuhne, utiliza como medio decolorante una solución de clorhidrato de anilina al 2 %, solución que prepara en el acto y que hace actuar durante cinco o diez minutos; luego termina la decoloración con alcohol de 85Vá 90° lavando luego y recoloreando siguiendo el método clásico.

El clorhidrato de anilina es un decolorante enérgico y menos perjudicial que los ácidos minerales, razón por la cual se lo utiliza especialmente para la coloración de bacilos en tejidos.

#### METODO DE LESIEUR

Técnica: Colorear en caliente con fucsina fenicada durante cinco minutos; 2º lavar con abundante agua; 3º decolorar con lacto-alcohol compuesto por 100 cc. de alcohol y 2 cc. de ácido láctico; 4º recolorar el fondo con azul de metileno. Es un buen método de decolora-

ción, pues se usa un decolorante que no es tan enérgico como pueden ser los ácidos minerales. Tiene el inconveniente de ser un método lento.-

#### MÉTODO DE WATSON & CHEYRIE

1-) Colorear en caliente con la fucina fenicada, durante cinco minutos.- 2-) Lavar con abundante agua; 3-) Decolorar con ácido fórmico.- 4-) Reactivar la decoloración con alcohol; 5-) Lavar; 6-) Coloración de fondo con solución acuosa muy diluida de azul de metileno.-

Conclusión: Tiene el inconveniente de ser un método lento como todos aquellos en que se utilizan como decolorantes ácidos orgánicos.-

#### MÉTODO DE KORNICK

1-) Coloración en caliente hasta desprendimiento de vapores, con fucina fenicada (de 3 a 5 minutos); 2-) Lavado con abundante agua; 3-) Decolorar en solución acuosa de sulfito de sodio el 10% hasta desaparición del color rojo; 4-) Lavar con abundante agua; 5-) Recolorar con solución acuosa de verde de malaquita.-

#### MÉTODO DE SCHULTE & TIGGES

Este método es idéntico al de Kornick con la diferencia de que utiliza, para la coloración de fondo, una solución saturada de ácido pírico.-

## MÉTODOS EMPLEADOS

Al principio hemos practicado en cada caso, primero una coloración siguiendo la técnica de Ziehl-Nielsen; segundo, una coloración siguiendo la técnica Schultz y Tigges.

Hemos dado luego preferencia al método de Schultz y Tigges, por ser el más exacto y estar más de acuerdo con las teorías modernas de la investigación del bacilo de Koch. Estudios hechos en el Instituto Bacteriológico del Departamento Nacional de Higiene sobre el valor comparativo de los principales métodos, llevaron a la conclusión de que el mejor de todos los métodos empleados es el de Schultz y Tigges, por las siguientes razones:

- 1-) Porque proporciona mayor porcentaje de casos positivos;
- 2-) Mayor cantidad de gérmenes por campo;
- 3-) La acción combinada del sulfito de sodio y del ácido pírico, parece que homogeniza y clarifica el medio en estudio, haciendo aparecer con más claridad el bacilo.

En nuestros casos practicamos coloraciones de fondo con ácido pírico en unos casos y con azul de metileno en otros.

Empleamos coloraciones de fondo con azul de metileno con el fin de poder practicar así un examen citológico más completo, que en algunos casos es muy interesante.

Con el fin de poder estudiar las características con que se presentan los bacilos, se hicieron extensiones en capas muy delgadas y homogéneas para facilitar así la observación microscópica.

Después las coloreamos en la forma que acabamos de indicar (decoloración con sulfito de sodio al 10% y coloración de fondo con azul de metileno).

La situación intra o extracelular del bacilo de Koch se la observó mediante la ayuda del tornillo micrométrico.

En esta forma hemos tenido ocasión de observar en algunos casos polinucleares neutrófilos que contenían en el interior del protoplasma restos de bacilos.

Estos polinucleares pertenecen con más frecuencia al grupo de los que poseen de dos a tres núcleos.

En la mayoría de los casos hemos observado que las formas bacilares fagocitadas, son principalmente formas de regresión de bacilos.

Es muy frecuente hallar estas formas en el interior del protoplasma de algunos leucocitos.

Hemos efectuado el examen indicado sobre quince casos, distribuidos de la siguiente forma: cuatro osteo-artritis de rodilla, tres Mal de Pott y ocho coxalgias.

Demos a continuación los resultados obtenidos en cada uno de los casos.

En todos ellos fué necesaria una observación microscópica muy minuciosa, de varias horas, sobre cada uno de los preparados.

Nº 1. Nombre...J.E. Nº de Hist...

Diagnóstico: SACRO-COXALGIA.

Resultado: Polinucleares conteniendo restos bacilares; rarísimos bacilos de Koch conteniendo uno o dos granulaciones.

Nº 2. Nombre...A.M. Nº de Hist...4719.

Diagnóstico: COXALGIA.

Resultado: Rarísimos bacilos de Koch tipo para-moniliformes. Una preparación con resultado positivo sobre cuatro negativas.

Nº 3. Nombre...S.S. Nº de Hist...4595.

Diagnóstico: COXALGIA.

Resultado: Muy raros bacilos de Koch. Algu-



nes polinucleares conteniendo gránulos alcohol ácido resistentes.

Nº 4 Nombre J. R. Nº de Hist...4024.

Diagnóstico: COXALGIA.

Algunos restos bacilares contenidos en el interior del protoplasma de leucocitos.

Nº 5 Nombre J. C.- Nº de Hist...3983.

Diagnóstico: COXALGIA.

Resultado del examen directo: Negativo.

Nº 6 Nombre J. G.- Nº de Hist...3429.

Diagnóstico: SACRO-COXALGIA.

Resultado: No se observaron formas bacilares en el examen directo.

Nº 7 Nombre J. S.- Nº de Hist...3821.

Diagnóstico: SACRO-COXALGIA (2ª intervención).-

Resultado: No se observaron formas bacilares.

Nº 8 Nombre J. A.- Nº de Hist...4556.

Diagnóstico: COXALGIA.

Resultado: Negativo.

Nº 9 Nombre G. R.- Nº de Hist...4402.

Diagnóstico: OSTEO-ARTRITIS DE RODILLA (1ª intervención).

Resultado : Negativo (en este caso la sangre extraída no pertenecía al foco hiperémico).

Nº 10 Nombre: A. M.- Nº de Hist...3993.

Diagnóstico: OSTEO-ARTRITIS DE RODILLA.

Resultado del examen directo: Negativo.

Nº 11 Nombre: L. P. N° de Hist...4634.

Diagnóstico: OSTEO-ARTRITIS DE RODILLA.

Resultado obtenido: Negativo.

Nº 12 Nombre E.D.- N° de Hist...4247.

Diagnóstico: OSTEO-ARTRITIS DE RODILLA.

Resultado: Muy raras corpúsculos alcohol ácido resistentes..

Nº 13 Nombre Z. L. N° de Hist...3267.

Diagnóstico: MAL DE POTT.-

Resultado: Negativo.

Nº 14 Nombre A. R.- N° de Hist...4460.

Diagnóstico: MAL DE POTT.

Resultado obtenido: Negativo.

Nº 15 Nombre: C. Z.- N° de Hist...4613.

Diagnóstico: MAL DE POTT.

Resultado: Negativo.

### CONCLUSIONES

COXALGIAS Obtuvimos sobre ocho casos estudiados, tres resultados positivos.

En estas afecciones tuvimos ocasión de registrar el mayor porcentaje de casos positivos, debido a que, como ya se dijo, en estas intervenciones la extra-

ción de la sangre se hace con relativa facilidad, pues generalmente, la cabeza femoral o lo que queda de ella constituye un foco hiperémico estrangulado tuberculoso por lo tanto, la sangre que brota al perforar el foco, es abundante, fácil de extraer y pura.

En los casos positivos hemos observado formas regresivas del bacilo de Koch, que se presentaron formando, agrupaciones más o menos abundantes de coconos, ácido, alcohol resistentes.

OSTEO-ARTRITIS DE RODILLA: Hemos registrado un solo caso positivo, sobre los cuatro estudiados.

Los resultados negativos se explican: 1<sup>o</sup>) Como en los casos negativos de las coxalgias, a que hemos empleado para la investigación del bacilo de Koch, un método muy poco sensible, como puede ser un examen directo de la sangre; 2<sup>o</sup>) A que en la mayoría de los casos trabajamos con sangre diluida; y 3<sup>o</sup>) A que en algunos casos no se dió con el foco, trabajando en estos casos con sangre normal.

MAL DE POTT: Obtuvimos resultados negativos en los tres casos estudiados.

Creemos que estos resultados se deben a la dificultad de extraer la sangre bien y, como en el caso anterior se hace impracticable la coloración del bacilo tuberculoso empleando éste método de coloración directa de la

**sangre.**

Inconvenientes del método directo: Este método ofrece inconvenientes en la coloración: 1ª) La coloración de una extensión de sangre coloreada por fucina se hace con dificultad, lo que hace correr el riesgo de una coloración prolongada; 2ª) Las granulaciones de los polinucleares eosinófilos, resisten a la decoloración dando lugar a errores de interpretación; 3ª) La cromatina de los núcleos es resistente a la decoloración, presentándose bajo aspecto de corpúsculos alcohol, ácido resistentes, dando lugar al inconveniente arriba indicado.

El método empleado es muy poco sensible pues se necesitan concentraciones elevadísimas de bacilos tuberculosos por cc. para obtener resultado muy debilmente positivo.

Esto es, implica que los resultados positivos revelan altas concentraciones de germen tuberculosos y en cambio los casos negativos no niegan la presencia de bacilos.

Todas estas desventajas hacen que en las investigaciones ulteriores hagamos abandonado el examen directo de la sangre, habiéndolo utilizado en estos casos tan solo a título ilustrativo, para conocer las características con que se presentaban los bacilos con respecto a los

leucocitos.

En resumen, este método de investigación directa no es aplicable en estos casos; por esta razón, hemos efectuado siempre otro examen directo previa homogeneización de la sangre.

### H O M O G E N E I Z A C I Ó N

Sabemos que cuando no se hallan bacilos con exámenes directos y tratándose de casos sospechosos, se aconseja investigarlos empleando cantidades mayores de sustancia.-

Esto se consigue mediante la homogeneización, es decir, reduciendo cierto volumen de sangre, por ejemplo, a una masa fluida y homogénea, que contenga en suspensión los bacilos, los que luego se separan mediante la centrifugación.

En toda homogeneización se hallan tres principios: 1º) Fluidificación: que consiste en la homogeneización de la sustancia que se obtiene mediante agentes que actúan dejando intacta la constitución.- 2º) La colección de los bacilos que se hallan en suspensión en el líquido homogeneizado, consiguiendo ésto mediante la centrifugación.- 3º) Hacer luego preparaciones con el producto aislado, efectuando luego coloraciones.

Los métodos de homogeneización de la sangre va-

rian según el modo con que se la fluidifica.

En unos casos se utilizan sustancias alcalinas como en el método de Bezangon y Philibert.

En otros se utiliza alcohol como en el de Bernard R. Debré y Baron.

En otros soluciones salinas concentradas de cloruro de sodio, como en el de Causson.

En el primer procedimiento, o sea el de Bezangon y Philibert, la homogeneización se hace con lejía de soda y el calor; se toma enseguida la densidad del líquido obtenido y se la lleva a 0.999 o 1.000 mediante la adición de alcohol a 50°.

Hay que reconocer que este procedimiento está muy lejos de ser perfecto; además se requieren cantidades considerables de sustancia a homogeneizar, inconveniente éste que no tiene mayor valor en el caso en que se trata de esputos; no así en el caso de sangre.

El segundo método, o sea el de Bernard R. Debré y Baron, es mucho más perfecto. Al salir de la vena 10 cc. de sangre, son inmediatamente tratados por 20 cc. de alcohol a 30°. Se completa enseguida la hemólisis de los glóbulos por adición progresiva de 30 cc. de alcohol a 40°. Se agita y se agregan luego 1 ó 2 gotas de una solución alcohólica de lejía de soda al 1/10.

Se centrifuga y se practican extensiones con el material sedimentado.

Este procedimiento es ciertamente superior al anterior. Janssima efectuó pruebas de sensibilidad de este método con los siguientes resultados:

80 millones de bacilos por cc. de sangre: las preparaciones se hallan muy cargadas de gérmenes;

40 millones de bacilos por cc. de sangre: las preparaciones son positivas y mucho menos cargadas que en el caso anterior.

8 millones de bacilos por cc. de sangre. Se halla alrededor de un elemento bacilar por cada cinco campos.

4 millones de bacilos de Koch por cc. de sangre; se halla alrededor de un elemento bacilar por cada 15 ó 20 campos.

800 mil bacilos por cc. de sangre. Se hallan uno o dos elementos bacilares por lámina.

80 mil a 8 mil bacilos por cc. de sangre. El examen minucioso de las láminas resulta negativo.

Como se ve trabajó con sangre con concentraciones decrecientes de bacilos de Koch.

Entos resultados hallados indican que a medida que la concentración bacilar disminuye, los resulta-

don se hacen tanto más inseguros. A partir de los 800 mil bacilos de Koch por cc., la investigación se hace muy difícil, siendo negativa debajo de esta concentración.

Con el fin de obtener un método más sensible para la investigación del bacilo de Koch, Causimón propuso uno en el cual la separación de los bacilos se hace en la superficie del líquido centrifugado, evitando de este modo todos los inconvenientes que pueden acarrear las decantaciones, como es la que hay que hacer en el caso anteriormente expuesto.

Técnica: Se sacan de la vena 10 cc. de sangre y se colocan en un tubo de ensayo que contenga 2 cc de una solución de citrato de sodio al 10%. Esta solución será esterilizada y se comprobará que ella no contiene ningún elemento ácido resistente. Se distribuye la sangre citratada en cuatro tubos de centrifuga y se centrifuga luego durante quince minutos. Se decanta cuidadosamente el líquido constituido por el plasma.

Recoger de cada tubo la parte superior del sedimento, reuniendo todo este material en un tubo de centrifuga. Agregar luego 5 cc. de una solución saturada de cloruro de sodio. Agitar fuertemente y centrifugar durante quince minutos. Se forma en la superfi-



cio del líquido un velo, con el cual se hacen preparaciones que luego se colorean.

Las pruebas de sensibilidad practicadas con este método dieron el siguiente resultado.-

400.000 bacilos de Koch por cc. de sangre.-Tres láminas fuertemente positivas, sobre quince.-

160.000 bacilos de Koch por cc. de sangre, ocho láminas positivas sobre ocho.-

40.000 bacilos de Koch por cc. de sangre, tres láminas positivas sobre ocho.

10.000 bacilos por cc. de sangre; Primera investigación, dos láminas positivas sobre siete. Segunda investigación, dos láminas positivas sobre cuatro.

5.000 bacilos de Koch por cc. de sangre, dos láminas positivas sobre nueve.

2.000 bacilos de Koch por cc. de sangre, cuatro láminas positivas sobre nueve.

1.000 bacilos de Koch por cc. de sangre, dos láminas positivas, sobre nueve.

100 bacilos de Koch por cc. de sangre. Resultados negativos.

Debajo de 1.000 bacilos por cc. de sangre: resultados negativos en todas las preparaciones.-

Los resultados hallados demuestran de una manera evidente que el método de Cassinon tiene una

verdadera ventaja sobre los demás métodos indicados, razón por la cual lo utilizamos en nuestras investigaciones.-

Una vez homogeneizada la sangre, siguiendo la técnica que acabamos de indicar, se practicaron extensiones de distintas espesores, una vez fijadas por el calor se colorearon, siguiendo las técnicas de Ziehl-Nielsen y la de Schulte & Tigges, en la forma que ya indicamos en la investigación por coloración directa de la sangre.

En nuestras investigaciones hemos utilizado encasamente cinco cc. de sangre, pues la cantidad que puede obtenerse en cada caso es relativamente escasa y más aún si con parte del material extraído hemos efectuado también inoculaciones.

Hemos practicado la investigación del bacilo de Koch mediante la homogeneización de la sangre; en cincuenta casos correspondientes a afecciones intervernales en el Servicio del Profesor Roberto de Levalle, durante los años 1929, 1930 y 1931.

Damos a continuación los resultados obtenidos correspondientes a veintiocho coxalgias, quince osteo-artritis de rodilla y diez casos de Mal de Pott:-  
Nº 1.- Nombre J. S.- Diagnóstico. Sacro-coxalgia. Resultado: Abundantes grupos de bacilos del tipo moniliforme-

ne con predominio del tipo largo. Rarísimos bacilos tipo homogéneos muy cortos.-

Nº 2.- Nombre J. S.- Diagnóstico: Sacro-coxalgia Estudio sobre sangre mezclada con pus, obtenida en la misma intervención. Se observaron gérmenes con las mismas características anteriores, hallándose en mayor cantidad.

Nº 3.- Nombre J. A.- Diagnóstico: Coxalgia.- Resultado: Muy raras bacilos del tipo moniliforme; conteniendo de dos a tres estrías, gránulos alcohol ácido-resistentes.

Nº 4.- Nombre J. G.- Diagnóstico: Sacro-coxalgia Resultado: Muy rarísimos bacilos de Koch, tipo homogéneos, largos, uno cada treinta o cuarenta campos observados; raras agrupaciones de cocos alcohol ácido resistentes.

Nº 5.- Nombre J. C.- Diagnóstico: Coxalgia Resultado: Grupos de seis a doce bacilos, tipo moniliforme, tipo corto, con predominio de dos a tres estrías cada uno; algunos paramoniliformes, presentando de dos a tres corpúsculos de resistencia en formación. Corpúsculos rojos sueltos en regular cantidad. Rarísimos bacilos de Koch tipo homogéneo, muy cortos.-

Nº 6.- Nombre V. Z.- Diagnóstico: Coxalgia. Resultado: Raras corpúsculos rojos agrupados.

Nº 7.- Nombre J. R.- Diagnóstico: Coxalgia. Resultado: Rarísimos bacilos del tipo paramoniliforme, tipo largo.

Nº 8.- Nombre: A. M.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Muy escasos bacilos de Koch del tipo paramoniliforme, uno cada treinta o cuarenta campos observados.-

Nº 9.- Nombre: S. S.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Regular cantidad de agrupaciones, conteniendo abundantísimos bacilos de Koch; se trata de bacilos moniliformes y para-moniliformes; conteniendo estos últimos de dos a tres corpúsculos, como puede verse en la figura 3. Al lado de estas formas pueden verse, algunos occos alcohol ácido resistentes, como así también restos bacilares.

Nº 10.- Nombre C. P.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Se observaron algunos bacilos homogéneos tipo largos, de siete a ocho micrones de largo; algunos apenas entriados.- Abundantes agrupaciones de numerosos occos alcohol ácido resistentes.

Nº 11.- Nombre F. H.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Abundantes agrupaciones de innumerables occos alcohol ácido resistentes, abundantes, aislados.

Nº 12.- Nombre C. B.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Rarísimos bacilos tipo moniliforme, dos o tres en un preparado de los cuatro observados.

Nº 13.- Nombre L. D.- Diagnóstico: Coxalgia: Rarísimos occos aislados alcohol ácido resistentes.

Nº 14.- Nombre M. S.- Diagnóstico: Coxalgia: Resultado: Rarísimos bacilos tipo moniliforme, tipo largo.

- Nº 15.- Nombre L. S.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Rarísimos bacilos con dos o tres granulaciones en formación.-
- Nº 16.- Nombre J. A.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Raros corpúsculos rojos.
- Nº 17.- Nombre S. J.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Rarísimos bacilos de Koch, tipo homogéneos muy ciertos.
- Nº 18.- Nombre B. S. Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Escasísimos gránulos alcohol ácido resistentes dispuestos en cadenas de tres ocos.
- Nº 19.- Nombre A. B.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Algunas agrupaciones de ocos alcohol ácido resistentes.
- Nº 20.- Nombre: A. C.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Rarísimos ocos alcohol ácido resistentes; escasísimos bacilos con corpúsculos en formación.-
- Nº 21.- Nombre C. U.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Escasísimos bacilos moniliformes tipo largo; un preparado positivo sobre cinco observados.
- Nº 22.- Nombre M. C.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Negativo en los cinco preparados observados.
- Nº 23.- Nombre A. S.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Negativo.
- Nº 24.- Nombre C. P.- Diagnóstico: Coxalgia; Resultado: Negativo en los cinco preparados observados (Primera intervención).-

- Nº 25.- Nombre M. D. - Diagnóstico: Coxalgia. Resultado: Negativo.
- Nº 26.- Nombre A. A. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Algunos corpúsculos de resistencia.
- Nº 27.- Nombre E. D. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Rarísimos cocos alcohol ácido resistentes.
- Nº 28.- Nombre M. G. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Segunda intervención: Abundantes cocos agrupados alcohol ácido resistentes.
- Nº 29.- Nombre V. F. - Diagnóstico: Osteoartritis de rodilla. Resultado: Algunos corpúsculos de resistencia.
- Nº 30.- Nombre M. L. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Rarísimos bacilos tipo baciliforme largo.
- Nº 31.- Nombre A. G. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Negativo.
- Nº 32.- Nombre M. G. - Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Primera intervención. Resultado: negativo en los cinco preparados observados.
- Nº 33.- Nombre A. M. -, Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Negativo en los cinco preparados observados.
- Nº 34.- Nombre G. R. - Diagnóstico: Osteoartritis de rodilla.

dilla. Resultado: Negativo.

Nº 35.- Nombre L. P.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Negativo.

Nº 36.- Nombre G. R.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla (Segunda intervención) Resultado: Negativo.

Nº 37.- Nombre F. F.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla Resultado: Negativo.

Nº 38.- Nombre N. K.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Negativo en los cinco preparades observados.

Nº 39.- Nombre M. G.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla. Resultado: Negativo.

Nº 40.- Nombre M. A.- Diagnóstico: Osteo-artritis de rodilla Resultado: Negativo.

Nº 41.- Nombre S. M.- Diagnóstico: Mal de Pott.- Resultado: Agrupaciones de cocos alcohol ácido resistentes, algunos bacilos de Koch tipo moniliformes, tipo largo, rarísimos bacilos homogéneos largos, algunos con úsculos de resistencia.

Nº 42.- Nombre J. A.- Diagnóstico: Mal de Pott.- Resultado: Muy raros bacilos tipo moniliforme, tipo largos.

Nº 43.- Nombre E. F.- Diagnóstico: Mal de Pott.- Resultados: Cocos alcohol ácido resistentes agrupados; rarísimos bacilos de Koch, tipo moniliforme cortos.-

Nº 44.- Nombre C. Z. Diagnóstico: Mal de Pott.- Resulta-

de: Rarísimos bacilos tipo baciliformes cortos.-

Nº 45.- Nombre: A. R.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Algunos gránulos alcohol ácido resistentes.

Nº 46.- Nombre: J. E.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Negativo.

Nº 47.- Nombre: C. Z.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Negativo.

Nº 48.- Nombre: N. N.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Negativo.

Nº 49.- Nombre: V. F.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Negativo.

Nº 50.- Nombre: M. M.- Diagnóstico: Mal de Pott. Resultado: Negativo.

### CONCLUSIONES

COXALGIAS : De los resultados obtenidos se desprende que sobre veintidós coxalgias estudiadas, obtuvimos veintidós casos positivos y tres negativos.

De los veintidós casos positivos hemos hallado tan solo cuatro que presentaron abundantes gérmenes.-

En los diez y ocho casos positivos restantes la presencia del bacilo de Koch se comprobó mediante una detenida y paciente observación microscópica de varias horas sobre cada uno de los preparados efectuados. Estos resultados positivos, como veremos más adelante, están de acuerdo con los obtenidos mediante las inyecciones.



OSTEO-ARTHRITIS DE RODILLA.- Sobre quince casos estudiados, obtuvimos resultados positivos en cinco. De éstos, no obtuvimos tan sólo un caso positivo franco; la búsqueda de los bacilos se hizo mediante largas y pacientes observaciones de cada preparado. Los resultados de las inyecciones, como veremos más adelante alcanzan un porcentaje mayor de positivos, lo que demuestra la ineficacia del método de investigación mediante la homogeneización en estos casos.

MAL DE POTT. En los casos de Mal de Pott, los resultados obtenidos son un poco más halagadores, consiguiendo un 50% de casos positivos, practicando como ya se dijo, observaciones totales de cada preparado.

Las formas bacilares que predominan en estos casos y que nos llamaron la atención, son especialmente agrupaciones de cocos alcohol ácido resistentes.

De lo anteriormente expresado se desprende que en los coxalgias hemos hallado un elevado porcentaje de resultados positivos; que este porcentaje casi corre paralelo con el hallado mediante la inyección.

Este porcentaje es muy pobre en el caso de las ósteo-artritis de rodilla y en los casos de mal de Pott, lo que hace que este método de investigación del bacilo de Koch se haga impracticable en estas afecciones.

Tal vez resida la causa en la dificultad enorme que hay

en extraer sangre pura de los focos extrangulados tuberculosos; pues siempre llega muy mezclada con la sangre normal, cosa que no sucede en las coxalgias; 2ª) en la dificultad que hay en ciertas ocasiones en dar con el foco extrangulado, cosa muy frecuente en las ósteo-artritis de rodilla.

### CARACTERÍSTICAS DEL BACILO

#### DE KOCH

En los exámenes microscópicos observados, tuvimos ocasión de ver que el bacilo de Koch presenta las siguientes características:

1ª) En la enorme mayoría de los casos hemos hallado bacilos noniliformes tipo corto, poseyendo especialmente cada uno, de dos a tres estrías.

2ª) Estos siempre se presentan agrupados constituyendo un conjunto más o menos numeroso como puede verse en la fig. 1.- En un caso perteneciente a una coxalgia que figura con el N.º tuvimos ocasión de registrar millares de gérmenes en un grupo de bacilos.

3ª) Al lado de esta forma de bacilo se hallaron con igual frecuencia el tipo paramoniliforme, en donde pudimos observar que cada bacilo poseía casi siempre de dos a tres granulaciones distribuidas en distintos puntos del cuerpo.-

4ª) Observamos además abundantes granulaciones alcoholí-  
coides resistentes las que en algunos casos se presen-  
tan libres, fig. 6 pero que generalmente se las vió agru-  
padas en cantidad más o menos considerable.

5ª) En algunos casos, observamos trozos de bacilos que  
representaban el último resto de aniquilación del mismo.  
Estos mismos tuvimos ocasión de verlos fagocitados por  
los leucocitos, al efectuar el examen microscópico de  
la sangre.

Como vemos, las formas bacilares que se obser-  
varon en estos casos, son formas atenuadas de bacilos,  
formas que se presentan en los casos en que más se han  
puesto en juego, las defensas individuales; es decir,  
propias de los procesos crónicos, muy antiguos, lenta-  
mente formados y ulcerados, tan comunes en las ósteo-ar-  
tritis que son motivo de este trabajo.-

### I N O C U L A C I Ó N

Con el fin de identificar las formas bacila-  
res halladas en los exámenes microscópicos directos;  
practicamos con una porción de la sangre obtenida: 1ª)  
una inyección, comprobando luego la naturaleza de las  
lesiones; 1ª) desde el punto de vista macroscópico y  
2ª) desde el punto de vista microscópico.

Inoculamos la sangre a estudiar en cobayos,  
por ser este un animal que presenta marcada sensibil-

dad hacia el bacilo tuberculoso.

Elegimos en todos los casos animales sanos de un peso de 400 a 500 gramos. Practicamos en cada caso una inyección por vía intraperitoneal.

Para cada caso se inocularon dos animales con cantidades variables de sangre. Investigamos sangre citratada en cantidades que oscilaron entre dos y tres cc.

Los grupos de cobayos inculados fueron aislados y observados especialmente. Se los sometió a la misma alimentación que tenían antes de ser inyectados. Se los pesó periódicamente y se vigiló su temperatura, su aspecto exterior, su vivacidad, su pelaje, etc.-

Tratándose de una inyección intraperitoneal, el animal no presentaba lesiones palpables (como en el caso de la inyección por vía sub-cutánea)

Por esta razón después de dos a tres meses de observación se sacrificó el animal practicando su autopsia. Sabemos que en los casos positivos que se tiene ocasión de observar, son:

Ganglios mesentéricos caseificados.

Hígado grande con tubérculos en su superficie.

Bazo hipertrofiado con tubérculos en su superficie.

Abundante líquido de ascitis.

Peritoneo infiltrado por tubérculos, etc.-

Una vez comprobadas las lesiones tuberculosas; aislamos en cada caso los órganos lesionados, o los nódulos, sometiénolos a la acción de una solución de formal al 10%, con el fin de practicar luego un examen microscópico.-

#### EXAMEN MICROSCÓPICO

1º) Efectuamos un examen histopatológico de los trozos de los órganos aislados con el fin de aclarar la naturaleza bacilar de la lesión; siendo este examen de mucha utilidad en los casos en que las lesiones eran dudosas.-

La técnica seguida fué la siguiente:

- 1º) Fijación durante 48 horas en formal al 10%
- 2º) Se hicieron cortes con las piezas fijadas; utilizando para ésto el micrótopo de congelación.
- 3º) Lavado de los cortes con abundante agua.
- 4º) Coloración con una solución de hematoxilina durante 10 minutos.
- 5º) Viraje de los mismos con agua.
- 6º) Coloración con una solución de eosina durante un minuto.-
- 7º) Deshidratación con alcoholes de 60º, 70º, 90º y 100º.-
- 8º) Clarificación con carbol-xilol.-
- 9º) Levantar y montar con bálsamo y observar.

En los casos positivos hemos observado, la presencia de folículos Koester, abundantes.

En el cuadro N- 1 damos a conocer los resultados obtenidos en cada caso estudiado.

A título ilustrativo hemos efectuado en las mismas piezas una coloración de bacilos. Obtuvimos muy buenos resultados siguiendo el siguiente método.

1<sup>a</sup>) Colorear en exceso los cortes (obtenidos por inclusión en parafina) en hematoxilina durante veinte a treinta minutos.

2<sup>a</sup>) Lavar con agua durante treinta minutos.

3<sup>a</sup>) Colorear con fucsina de Ziehl durante treinta minutos a una hora a 37<sup>o</sup>.-

4<sup>a</sup>) Decolorar los cortes calientes durante un minuto en alcohol clorhídrico.

5<sup>a</sup>) Lavarlo durante dos o tres minutos en alcohol a 70%.-

6<sup>a</sup>) Lavar con agua.

7<sup>a</sup>) Pasar en una solución diluida de carbonato de litio (una parte de una solución saturada por diez de agua) hasta que los cortes aparezcan azules.-

8<sup>a</sup>) Lavado con agua durante cinco a diez minutos.-

9<sup>a</sup>) Alcohol a 90<sup>o</sup>, cinco minutos. Alcohol absoluto. Xilol. Bálsamo.-

En esta forma los bacilos tuberculosos aparecen intensamente teñidos en rojo, resaltando sobre el fondo azul violeta.

El decolorante utilizado en este método, alcohol clorhídrico (una parte de HCl por 100 cc. de alcohol a 70°) no altera la estructura del tejido; pudiéndose, por lo tanto, efectuar al mismo tiempo un estudio histopatológico.

En los casos positivos observamos abundantísimos bacilos de Koch, los que se hallaban contenidos en los folículos de Koester. Como en el examen directo, tuvimos ocasión de comprobar que la forma predominante es el tipo bacilar largo.

En el cuadro N° 1 damos a conocer los resultados obtenidos en estas investigaciones, como así también los hallados en el examen macroscópico de la inoculación; comparándolos al mismo tiempo con los obtenidos mediante el examen directo.

### C O N C L U S I O N E S

Los resultados obtenidos y que figuran en el cuadro N° 1, no hacen más que poner en evidencia las enormes ventajas que posee el método de investigación del bacilo tuberculoso, mediante la inoculación, sobre la búsqueda del mismo utilizando el examen directo previa homogeneización.

No sólo existen estas ventajas desde el punto de vista cualitativo, sino también desde el punto de vista cuantitativo, pues mediante la inoculación de pequeñas cantidades de sangre, obtuvimos resultados francamente positivos; evitándose también el tiempo empleado en minuciosas, largas y penadas observaciones microscópicas, con el fin de llegar a obtener resultados débilmente positivos, como puede observarse en el cuadro N<sup>o</sup> 1.-

El único inconveniente que puede hallarse, empleando el método de investigación mediante la inoculación, es el tiempo largo que hay que esperar con el fin de que se produzcan las lesiones tuberculosas, tiempo éste que puede abreviarse, en el caso en que se recurre a un reactivo.

De los resultados obtenidos y que figuran en el cuadro N<sup>o</sup> 1 deducimos que sobre cincuenta casos; mediante la inoculación, obtuvimos treinta y dos casos positivos y doce negativos; es decir un 76% de casos positivos.

Los casos negativos registrados responderían tal vez, en la forma en que se ha podido extraer la sangre, dadas las grandes dificultades que existen para obtenerla aislada de la sangre total normal; o también puede obedecer, como ya dijimos en otras ocasiones, a la di-



fiicultad en que hay en ciertos casos en llegar al foco estrangulado tuberculoso, caso muy común en las ósteo-artritis de rodilla, de codo, de pié, de muñeca, etc. y que en donde hemos registrado mayor número de casos negativos.

<u>Nº de Orden</u>	<u>Iniciales</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Examen directo</u> <u>Resultado</u>	<u>I N O C U L</u> <u>Examen Macroscópico</u>	<u>A G I C</u> <u>Examen</u>
1	J. S.-	Coxalgia	Positivo franco	Esplenitis, hepatitis y epiploitis tuberculosa.	Abund
2	"	"	" "	Idem, idem.	
3	J. A.-	"	" débil	Peritonitis tuberculosa.	
4	J. G.-	"	" muy "	Hepatitis tipo folicular.	
5	J. C.-	"	" franco	Hepatitis y esplenitis tipo folicular.	
6	V. Z.-	"	" débil	Peritonitis tuberculosa.	Algun
7	J. R.-	"	" "	"	
8	A. M.-	"	" muy "	"	
9	S. S.-	"	" franco	Ganglios mesentéricos caseificados. Peritonitis tuberculosa.	Abund
10	C. P.-	"	" "	Esplenitis y hepatitis tipo folicular.	
11	F. E.-	"	" débil	Esplenitis tipo folicular.	
12	O. B.-	"	" muy "	Esplenitis y hepatitis tipo folicular.	
13	L. D.-	"	" " "	Idem.	
14	M. S.-	"	" " "	Idem.	
15	L. S.-	"	" " "	Idem.	
16	J. A.-	"	" " "	Idem.	
17	S. Y.-	"	" " "	Idem.	
18	E. S.-	"	" " "	Esplenitis tipo folicular.	
19	A. B.-	"	" " "	Negativo.	Folic
20	A. C.-	"	" " "	"	
21	I. C.-	"	" " "	Abundante líquido de ascitis, hepatitis tuberculosa.	Abund
22	M. C.-	"	" " "	Hepatitis y esplenitis tipo folicular.	
23	C. P.-	"	Negativo	Negativo.	
24	A. S.-	"	"	Esplenitis folicular.	Ab. f
25	M. D.-	"	"	Negativo.	

<u>N O C U L A C I Ó N</u> <u>a Macroscópica</u>	<u>Examen histopatológico</u>	<u>Examen Microscópico</u> <u>Bacilos en tejidos.</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
itis, hepatitis loítis tubercu- -losa. idem.	Abundantes folículos de Koester.	Gran cantidad.	-
idem.	Idem	Idem.	Idem
itis tubercu- -losa.	"	"	-
itis tipo foli- -cular.	"	"	-
itis y espleni- -to foliular.	"	"	-
itis tubercu- -losa.	Algunos folículos de Koester.	"	-
-	-	"	-
-	-	"	-
-	-	"	-
os mesentéri- -seificados. Pe- -tis tuberculo- -sa.-	Abundantes folículos de Koester.	"	-
itis y hepati- -to foliular.	Idem	"	-
itis tipo foli- -cular.	"	"	-
itis y hepati- -to foliular.	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
"	"	"	-
itis tipo foli- -cular.	Folículos de Koester	Bacilos de Koch.	-
itivo.	Negativo	Negativo.	-
"	"	"	-
ite líquido de , hepatitis tu- -berculosa.	Abundantes folículos de Koester	Abundantes bacilos de Koch.	-
itis y espleni- -to foliular.	Idem.	Idem.	-
itivo.	Negativo.	Negativo.	-
itis foliular.	Ab. fol. Koester.	Ab. bac. de Koch.	-
itivo.	Negativo.	Negativo.	-

<u>Nº de orden</u>	<u>Iniciales</u>	<u>Diagnóstico</u>	<u>Examen directo</u> <u>Resultado</u>	<u>I N O C U L A C I O N</u> <u>Examen Macroscópico</u>	<u>Examen</u>
26	A.A.-	Osteoartritis de rodilla.	Positivo muy débil.	Esplenitis y hepatitis tipo foliolar.- Idem.	Algun
27	E.D.-	"	"	"	
28	M.G.-	"	Positivo.	Ganglios mesentéricos caseificados.	
29	V.F.-	"	Idem muy débil	Hepatitis tipo foliolar	
30	M.L.-	"	"	Idem. Abundante líquido de ascitis.	
31	A.G.-	"	Negativo.	idem. Esplenitis tuberculosa.	
32	M.G.-	"	"	Negativo.	
33	A.M.-	"	"	Peritonitis tuberculosa.-	Algun
34	G. Rv	"	"	Negativo.	
35	L.P.-	"	"	"	
36	G.R.-	"	"	"	
37	F. Fv	"	"	Ganglios mesentéricos caseificados.	Regu de f
38	N.N.2448.	"	"	Negativo.	
39	M.G.-	"	"	Esplenitis y hepatitis tipo foliolar.-	Abun los
40	M.A.-	"	"	Negativo.	
41	S.M.-	Mal de Pott.	Positivo.	Ganglios mesentéricos caseificados. Esplenitis y hepatitis foliolar.	Abun d
42	J.A.-	" " "	"	Idem.	
43	Z.F.-	" " "	Idem débil	Hepatitis y esplenitis tuberculosa.	Foli
44	C.Z.-	" " "	Idem muy débil	Idem.	
45	A.R.-	" " "	" " "	Idem.	
46	J.E.-	" " "	" " "	Hepatitis foliolar.-	Foli
47	C.S.-	" " "	Negativo.	Peritonitis tuberculosa	
48	V.F.-	" " "	"	Negativo.	
50	N.M.-	" " "	"	"	

<u>C U L A C</u> <u>Examen Microscópico</u>	<u>I Q N.-</u> <u>Examen Histopatológico</u>	<u>Examen Microscópico</u> <u>Bacilos en tejido</u>	<u>OBSERVACIONES</u>
s y hepatitis licular.- em.	Algunos folículos de Koester Idem.	Abundantes bacilos de Koch Idem.	-
mesentéricos eficados.	"	"	-
tipo foliular	"	"	-
dante líquido ascitis.	"	"	-
entis tuber- ulosa. gativo.	"	"	-
is tuberculo- sa.- gativo.	Negativo.	Negativo.	Primera interven- ción no dió en foco
is tuberculo- sa.- gativo.	Algunos folículos de Koester. Negativo.	Abundantes bacilos de Koch. Negativo.	-
"	"	"	-
"	"	"	2a. intervención.
mesentéricos eficados.	Regular cantidad de fol. de Koester. Negativo.	Abundantes bacilos de Koch. Negativo.	-
s y hepatitis licular.- gativo.	Abundantes folícu- los de Koester. Negativo.	Abundantes bacilos de Koch. Negativo.	-
mesentéricos dos. Esplenitis is foliular. em.	Abundantes folículos de Koester. Idem.	Abundantes bacilos de Koch. Idem.	-
y esplenitis berculosa. em.	Folículos de Koester. Idem.	Alg. bacilos de Koch. Idem.	-
em.	"	"	-
foliular.-	Folículos de Koester.	Ab. bacilos de Koch.	-
is tuberculosa	Idem.	Idem.	-
ativo.	Negativo.	Negativo.	-
"	"	"	-

## C U L T I V O S

Con el fin de obtener una segunda prueba de identificación del bacilo de Koch, puesto en evidencia por el examen directo, recurrimos a medios de cultivos; es decir, a otro método tan sensible como la inoculación y que nos permite conocer los resultados en un plazo más breve de tiempo.

Hemos efectuado inoculaciones tan sólo en los casos en que la cantidad del material extraído permitió efectuarla.

Como podremos ver, estas investigaciones se hicieron especialmente con sangres extraídas de coxalgias; por poder recoger, durante estas intervenciones, cantidades mayores de sangre, por las razones ya indicadas.

En los casos de ósteo-artritis de rodilla y de mal de Pott, el material extraído fué relativamente escaso; alcanzándonos escasamente para la investigación mediante el examen directo y para la inoculación.

Para efectuar cultivos de la sangre extraída hemos tenido en cuenta los siguientes métodos: Petraghiani, Lowenstein, Petroff y Besredka.-

### MÉTODO DE PETRAGHIANI

A 300 grs. de leche se agregan 12 grs. de fécula o harina de papas, se añade dos gramos de peptona y dos trozos medianos de papa. Se calienta hasta que se

espese como engrudo, lo que generalmente sucede a los 10 minutos, siempre hay que revolver la mezcla, dejándola luego durante una hora a baño maría. Inseguida se deja enfriar hasta más o menos 50° y se le agregan ocho huevos frescos más la yema de otro, que previamente han sido bien mezclados y emulsionados, agitándolos con perlas de vidrio y añadir también 24 gramos de glicerina y 20 cc. de una solución acuosa de verde de malaquita al 2% (Hoscht). Se mezcla bien (filtrar por gasa), luego se reparte en tubos y se coagula y esteriliza. El método del autor es el siguiente para esterilizar: se tinaliza durante 3 días, el primer día: 20 minutos a 80°; el segundo, 15 minutos a 75° y el tercero lo mismo. El procedimiento usado en la Cátedra de Bacteriología es calentar durante una hora dos días seguidos a 85° y el método es 25 minutos a 85° dos veces.- El método de Lowenstein publicado ultimamente en Detsch. Med. W. ch. 13. VI. 1930 es:

0,4 % de monofosfato de potasio  
 0,4 % de sulfato de magnesio  
 0,1 % de citrato de magnesio  
 0,6 % de asparagina  
 2 % de glicerina

A 120 cc. de esta solución agregar 6 gr. de fécula. Baño maría 2 horas. Enfriar a 50°, 4 huevos enteros y 10 cc. de solución al 2% de rojo. Filtrar, entubar y coagular en posición inclinada.- Otro medio de Lowenstein es el siguiente:

Asparagina... 5,0 grs.  
 Lactato de amonio... 6,0 "    nada  
 Fosfato de sodio (neu) 3,0 "  
 Cloruro de sodio    6,0 grs.  
 Glicerina..... 40,0 "

Preparación: El artículo no indica el uso del agua como disolvente. El lactato de amonio puede omitirse si se desea. Esteri-

espese como engrudo, lo que generalmente sucede a los diez minutos, siempre hay que revolver la mezcla, dejándola luego durante una hora a baño-maría.- Enseguida se deja enfriar hasta más o menos 50° y se le agregan ocho huevos frescos más la yema de otro, que previamente han sido bien mezclados y emulsionados, agitándolos con perlas de vidrio y añadir también 25 grs. de glicerina y 20 cc. de una solución acuosa de verde de malaquita al 2% (Hoscht).- Se mezcla bien (filtrar por gasa), luego se reparte en tubos y se coagula y esteriliza. El método del autor es el siguiente para esterilizar: se tinaliza durante tres días, el primer día: 20 minutos a 80°; el segundo: 15 minutos a 75° y el tercero lo mismo. El procedimiento usado en la Cátedra de Bacteriología es calentar durante una hora dos días seguidos a 85°.

#### MÉTODOS DE LOWENSTEIN

##### Componentes:

Asparagina	6,0 grs.
Lactato de amonio	6,0 " o nada
Fosfato de sodio neutro:	3,0 "
Cloruro de sodio	6,0 "
Glicerina	40,0 "

Preparación: El artículo no indica el uso del agua como disolvente. El lactato de amonio puede omitirse



Indicación. No es específica. Uso.- Cultivo del bacilo de la tuberculosis.-

Bibliografía: Lowenstein Ernest. "Beitrag zur Chemie des Tuberkelbacillus". Centr. f. Bakt. Vol. LXVIII. pp.- 591-593; Año: 1913.-

- - - - -

Componentes:

- 1 ) Agua destilada.....1000 cc.-
- 2 ) Fosfato de amonio..... 6.0 gr.-
- 3 ) Glicerina.....40.0 "

Preparación: Disolver 2 y 3 en 1.- esterilización No está especificada.- Uso: Cultivo del bacilo de la tuberculosis. El desarrollo del bacilo es muy pobre en este medio. Sodio, Potasio, cloro e azufre es necesario para su crecimiento.-

Variantes: A).- Lockemann especificaba el uso de  $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$  3  $\text{H}_2\text{O}$  y agregaba  $\text{MgCO}_3 - 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0.6 gr. de esta última sustancia.- B) Lockemann también además de estas dos últimas sustancias agrega 3.0 gr.-de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ .-

Bibliografía: Lowenstein Ernest "Beitrag z. Chemie des Tuberkelbacillus" Centr. f. Bakt. Vol LXVIII. pp.591-3.-Año. 1913; Lockemann George "Welche Nahrungstoffe sind für das Wachstum der Tuberkelbazillen unbedingt notwendig?" Centr. f. Bakt. Vol LXXIII. pp.420/5. año. 1913.-

-----

Componentes:

- 1 ) Agua.....1000 cc.-
- 2 ) Carbonato de amonio  
(COM) 3.5 gr.-

- 3) Fosfato primario de potasio: 1,5 grs.
- 4) Sulfato de magnesio 2,5 "
- 5) Glicerina 15,0 "

Preparación: Disolver 2, 3, 4 y 5 en l.-  
 Reitr. z. Chem. Tuberk. bac. - Contr. f. Bakter. Vol LXVIII  
 pp. 591-3 - Año 1913 y Harvey. Bacter. & Laboratory tech.  
 Sec. - 11. Ind. J. Med. Res. Vol 1X. p. 103. Años. 1921/32.

Los importantes medios de cultivo de Petroff y Benredka, se detallan en la página siguiente.-

Para llegar a hacer un cultivo con sangre de foco hiperémico tuberculoso; sometimos a la misma a las siguientes manipulaciones:

1<sup>a</sup>) Extrajimos sangre citrada, en perfecto estado de asepsia y luego hicimos actuar sobre la misma ácido sulfúrico en una concentración suficiente para destruir todos los gérmenes asociados que la sangre puede tener, respetando al bacilo de Koch; luego se agitó durante diez minutos, centrifugando después durante quince.

2<sup>a</sup>) Se decantó con cuidado y con el sedimento obtenido efectuamos varias siembras para cada caso. Los medios ya sembrados se dejaron en la estufa, a una temperatura de 37°, durante quince días; tapándolos cuidadosamente los primeros días para evitar desecación. Al cabo de este tiempo en los tubos observados, se hallaron, en los casos positivos, desarrollos francos.-

### MEDIO DE BESREIKA & JUPILLE

- 1ª) Solución de clara de huevo al 1/10 en agua destilada.....20 cc.
- 2ª) Solución de yema de huevo al 1/10 en agua destilada.....20 cc.
- 3ª) Caldo no peptonado adicionado de 2% de gelatina.....100 cc.

La solución de clara de huevo es filtrada sobre algodón hidrófilo, calentado a 100° y enseguida filtrada con papel Chardin y esterilizada a 115°, durante minutos.

La solución de yema esta adicionada de soda normal (aproximadamente 1%) hasta la clarificación casi completa, calentado a 100°, filtrado a continuación sobre papel Chardin y esterilizado a 115°, durante veinte minutos. Las dos soluciones (1 y 2) se mezclan con el caldo gelatinoso, líquido en las proporciones indicadas (2 cc. de solución de clara y 2 cc. de solución de yema para 10 cc. de caldo gelatinoso).-

### MEDIO DE PETROFF

La preparación de este medio, minuciosamente indicada por Limousin es la siguiente: Se toma un cierto número de huevos frescos, desinfectando sus cáscaras por inmersión de treinta minutos en alcohol a setenta grados, se los seca con un paño esterilizado, romperlos en un vaso esterilizado, manipulándolos con guantes de

caucho, si es posible; después batirlos. Se filtra sobre gasa. Por otra parte se toma un trozo de carne de ternera fresca y se la corta haciendo uso de un instrumento esterilizado. Se la hace macerar en la heladera durante una noche:

Carne de ternera.....250 grs.

Agua destilada.....212 "

Glicerina.....37,5"

Al día siguiente se filtra la maceración sobre gasa. El líquido así obtenido se mezcla con el resultante del filtrado de los huevos, en las siguientes proporciones:

Filtrado de carne de ternera.....100grs.

Filtrado de huevos.....200 "

A esta nueva mezcla, agregar solución de violeta de genciana, según:

Violeta de genciana.....1 gramo.

Alcohol a 90°.....100 cc.-

a la dosis de un centímetro cúbico por cien del medio. Agitarlo y distribuirlo en tubos.- La coagulación se efectúa llevando los tubos inclinados y sometiéndolos a la temperatura de 85°, durante treinta minutos. Es necesario vigilar cuidadosamente el tiempo de la operación. No se debe pasar de 85° a 86°, sin perjuicio de que el medio pierda gran parte de su poder nutritivo. Al día

siguiente y al otro día, se llevan nuevamente los tubos a 75°, durante media hora, para asegurarse la esterilización mediante la tyndalización. El medio así obtenido es de color lila.

Aspecto de los cultivos: Las jóvenes colonias de bacilos de Kosh presentan al principio un color violeta, que pierden con el tiempo, para presentar un color amarillo pajizo al cabo de algunas horas. Su aspecto es característico. Son puntos violetas un poco más oscuros que el medio, despulidos, sobrelevantados; al cabo de dos días, el centro se torna amarillo, la colonia aumenta un poco de volumen hasta su completo desarrollo y adquieren un tinte amarillo-pajizo.- Los productos ricos en bacilos dan en general un cultivo rápido y en napa, al cabo de dos o tres semanas. Aquellos que son más pobres en bacilos dan colonias más raras que emplean a menudo muchas semanas para desarrollarse. Sin embargo no existe concordancia absoluta entre la riqueza en bacilos y la rapidez del desarrollo.

#### MEDIO DE BESREKA Y MEDIO DE DESPEIGNES

NES : Este nuevo medio es una mezcla del medio de Besredka esterilizado, con leche hervida y glicerina incorporada a la gelatina, coloreada con el violeta de geniana. En primer lugar se prepara el medio al huevo de Besredka, reuniendo en un vaso con pié la yema de veinte

Besredka ha simplificado el método  
secompone unicamente de yemas de huevos, y de agua destilada, 20 grs por litro. Se alcaliniza y se esteriliza al autoclave.

huevos (aproximadamente 350 cc), añadiendo un litro de agua destilada pura y neutra o neutralizada. La clarificación se lleva a cabo mediante una emulsión de soda al 1%, con las precauciones necesarias. Se completa luego hasta siete litros, con agua destilada; se reparte y se esteriliza durante veinte minutos a la temperatura de 110°.

Es conveniente preparar una provisión de este medio en épocas en que los huevos no sean costosos y utilizar, a medida que las necesidades lo vayan requiriendo, para preparar el medio definitivo.-

Esto se obtiene agregando doscientos cc. del medio de Besredka, cien cc. de leche descremada hervida quince gramos de glicerina y nueve gramos de agar, esta mezcla se hace en un gran balón que se calienta al baño maría, hasta que el agar se disuelve por completo. A continuación se esteriliza en el autoclave a 105° y se le añade, antes de que se enfríe, tres cc. de solución alcohólica al 1% de violeta de genciana. No quedará más que repartir asepticamente en los tubos, puestos en posición inclinada. Para mayor prudencia, estos tubos son sometidos, durante media hora, tres días seguidos, a una temperatura de 55° a 57°.

Así preparado, este medio jamás se ha contaminado y se conserva muy bien. (Despeignes).

El examen microscópico de las colonias obtenidas

se hace siguiendo los métodos clásicos de coloración del bacilo de Koch, teniendo cuidado de no prolongar mucho la acción del ácido y del alcohol, cuando se trata de cultivos muy jóvenes, debido a que éstos poseen bacilos poco resistentes a la decoloración.

Para hacer los frotis destinados para el examen microscópico, es conveniente disociar las colonias de gérmenes extraídos; con una gota de clara de huevo que se ha colocado en el centro del porta-objetos.

En esta forma conseguimos que el material extendido se adhiera bien a la lámina. Una vez bien disociado el material se deja secar, luego se fija y por último se colorea. En esta forma los bacilos se presentan en pequeños paquetes cerrados.

Como vemos, la investigación del bacilo de Koch, por los medios de cultivo, es relativamente sencilla. Esta investigación no presenta ninguna dificultad cuando se trata de productos puros, es decir, libres de otros gérmenes, esta tarea se complica cuando al lado de este germen, encontramos otros asociados cuyo desarrollo es más rápido; y por tanto destruye el desarrollo del bacilo tuberculoso.

Es por esta razón que en los distintos medios de investigación del bacilo de Koch, mediante cultivos, se tiene como fin destruir los gérmenes asociados sin llegar



a dañar la naturaleza del bacilo. Con este fin se utilizan antisépticos en vapores o en solución dando lugar de este modo a diversos métodos.-

El formal ha sido preconizado por Spengler, Piatrowsky; la autoformina por Uhlenhut; la potasa por Ditthorn y W. Schultz; la soda por Petroff; el calentamiento discontinuo a 54° durante varios días, por Nattan Larrier y, por último el ácido sulfúrico, que es el que utilizamos en nuestro caso.

### C O N C L U S I O N E S

Hemos efectuado la investigación del bacilo de Koch mediante cultivos sobre veinte casos de afección de coxalgias. En todos éstos hemos comprobado resultados que estaban completamente de acuerdo con los hallados mediante la inoculación.

Mediante este método de investigación del bacilo de Koch puede conocerse un resultado: 1°) En un tiempo más breve; 2°-) Con menos dificultades que cuando se emplea como medio la inoculación.

- - - - -

### ESTUDIO MICROQUIMICO

De los conocimientos adquiridos sobre focos estrangulados tuberculosos, nos indujeron a estudiar directamente en la sangre que contiene los focos tuberculosos estrangulados, desde el punto de vista microquímico.

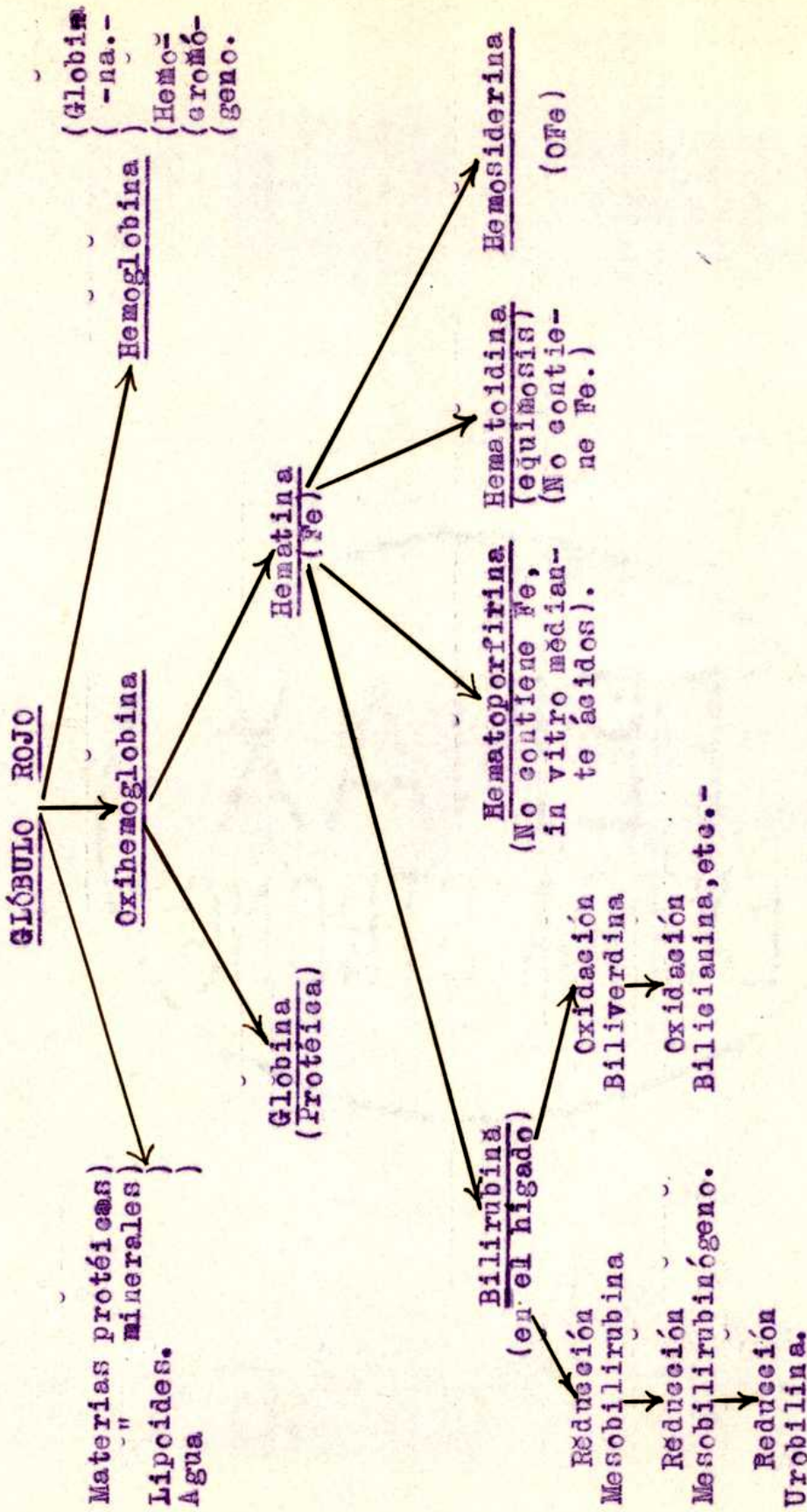
Ya dijimos que la sangre estancada, extravasada sufría transformaciones. Antes haremos un resumen de las transformaciones biológicas del pigmento hemático, a fin de demostrar el origen de los elementos que buscamos y que son la hemosiderina y la hematoidina.-

Sabemos que la hemoglobina al desintegrarse, ya sea fisiológicamente, dentro de las células del sistema retículo endotelial del bazo; ya sea fisiológicamente en los hematomas, focos de su fusión sanguínea, equimosis, zonas de extravasamento, primordiales bajo la acción de fermentos intracelulares, producen los elementos arriba mencionados.

Damos a continuación a conocer los elementos de transformación de la hemoglobina mediante el cuadro que figura en la página siguiente.-

Como indica el cuadro la bilirubina, la hemato-porfirina y la hematoidina son tres isómeros derivados de la hematina con pérdida de ión Fe, encontrándose éste al estado de hemosiderina.

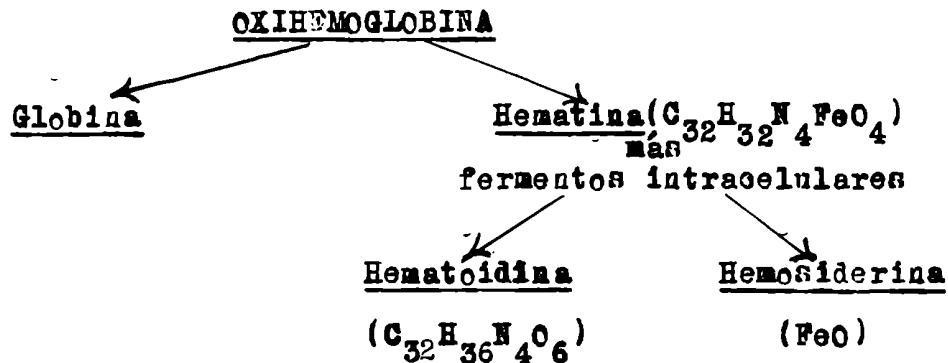
Como se sabe el pigmento hemático es un compuesto cuya molécula contiene hierro. El proceso de desintegración consiste en la sustracción de la molécula de este metal; de modo que por un lado el Fe queda libre bajo el estado de óxidos de hierro (hemosiderina) y por otro lado un compuesto mucho más complejo, la llamada hematoidina



NOTA.- Bilirubina isómero de la hematoporfirina isómero de la hematoidina.

todo esto se produce bajo la acción de ciertos fermentos intracelulares.

Lo que acabamos de indicar puede esquematizarse en la siguiente forma:



HEMOSIDERINA: Perls fué el primero que caracterizó esta sustancia, poniéndola en evidencia mediante la reacción microquímica del hierro. Se utiliza para este fin HCl y ferrocianuro de potasio, sosteniendo que se trataba de un estado inicial de la hematoídina, sosteniendo que la hemoglobina algo alterada, podía dar la reacción de azul de Prusia.-

Quincke & Hunter pensaban que se trataba de un albuminóide que contenía hierro, pero más tarde las investigaciones de Bionelo, confirmadas por Hueck, demostraron que se trataba simplemente de OFe ó hierro puro tal vez en estado coloidal.

La hemosiderina aparece en los preparados en fresco, en forma de bloques amarillentos, que se tornan

azules bajo la acción de la reacción de Perls o sea la del azul de Turnbull (ferrocianuro y ácido clorhídrico).

Estos bloquecillos de cristales de hemosiderina se encuentran en muy pequeñas cantidades en las células del tejido del retículo endotelial del bazo.

Solamente en condiciones patológicas, naturales o experimentales, la cantidad de hemosiderina aumenta en el tejido del retículo endotelial del bazo, aumentando también en las células del retículo endotelial del hígado, (células de Kupffer), en la médula ósea, en los ganglios, en fin, aparece en todos los órganos que poseen este tejido constituyendo lo que se llama una hemosiderina polivisceral.

Más tarde, estudiando experimentalmente, la formación de la hemosiderina, se observó que para que el hierro se llegue a separar del pigmento hemático, es necesario que se produzca una elaboración en el protoplasma celular, para lo cual se requieren varios días. Por ejemplo, si a animales sometidos a la acción de venenos hemáticos y luego sacrificados con distintos intervalos de tiempo, se verifica que dentro de las 24 horas, la cantidad de pigmento formal es considerable, habiendo completa ausencia de hemosiderina, apareciendo ésta en cantidad apreciable en los días subsiguientes.

Del Río Ortega y Giménez de Asúa, comprobaron que

provocando una pequeña hemorragia cerebral mediante una punción en el cerebro los histocitos cerebrales (microglia) acuden al foco hemorrágico, englobando los hematíes extravasados, comenzando a digerirlos, pero la hemosiderina sólo aparece al quinto o sexto día.-

De estas experiencias se deduce que la hemosiderina es un derivado hemoglobínico que se observa en los focos hemorrágicos y que su aparición es tardía, punto fundamental si se tiene en cuenta que el foco hiperémico tuberculoso existe sangre estancada que sufrirá lentamente su transformación química.

El hierro originado en la destrucción fisiológica de los hematíes queda retenido en las células del sistema del retículo endotelial, hasta llegar el momento en que el organismo lo aprovecha para efectuar la síntesis de la hemoglobina.

Pretendemos recordar todos estos conocimientos adquiridos hasta el presente, respecto a la hemosiderina porqué:

1º) Queremos insistir en la importancia enorme que tiene el sistema retículo endotelial en el metabolismo de la hemoglobina.

2º) La lesión ósea tuberculosa se localiza inicialmente, como ya se dijo, en la médula ósea (medulitis tuberculosa) parte del organismo, por decir así, muy rica en te-

rido retículo endotelial.

3º) La hemosiderina, producto de desintegración de la hemoglobina, se encuentra en todos los casos de congestión pasiva, éxtasis sanguíneo, extravasamiento y es fagocitada, en su mayor parte, por células dependientes del sistema retículo endotelial, elaboradas a expensas de sus propios fermentos.

4º) Los trabajos experimentales de Von Lignas en los traumatismos y los del Prof. Robertson Lavalle, demuestran la existencia de esta sustancia en los focos hiperémicos tuberculosos, en donde la sangre al estancarse se transforma, quedando libre la hemosiderina en el interior de las células macrófagas, semejantes a las células de hemosiderina o células cardíacas que se hallan en la congestión pulmonar.

En conclusión, la investigación de la hemosiderina es un medio indirecto de comprobar la existencia de focos de sangre estancada, focos de éxtasis, focos de estrangulamiento, fuere cual fuere la denominación preferida.

HEMATOIDINA: Los primeros estudios sobre este compuesto comenzaron con Virchow que observó que en los focos hemorrágicos había cristales a los que denominó como hematoidina, semejantes a los cristales de bilirubina, su isómero y que con ácido nítrico, nítrico, producen la gama de los colores de la reacción de Gruelin, propia de los pigmentos biliares.

Análisis hechos por varios autores confirman la identidad de ambas sustancias.

Es menester objetar que la formación de la hematoïdina en los focos hemorrágicos puede ser un proceso diferente que el producido por la destrucción hemática fisiológica, en lo que conviene establecer distinción.

La hematoïdina se presenta bajo la forma de cristales anaranjados o amarillos pardos, o bien amorfos, tiñendo en forma difusa el tejido en amarillo.

Con el  $\text{SO}_4\text{H}_2$  adquiere un color verde. Se destruye lentamente en los álcalis. Es difícilmente soluble en los disolventes ácidos y resiste a los líquidos decolorantes.

Se conduce negativamente con los colorantes básicos de las grasas y de los lípidos, como también con el ácido ósmico y el nitrato de plata.

La hematoïdina se presenta simultáneamente con grupos albuminóideos ricos en sales de calcio, ésto como ya se explicó demuestra la razón por la cual se ven radiográficamente los focos hiperémicos. Hemos querido recordar estos conocimientos por la gran importancia que tienen en el diagnóstico experimental de este foco.

- - - - -

#### TÉCNICA SEGUIDA PARA INVESTIGAR

#### LA HEMOSIDERINA

La recolección de la sangre se hizo en la siguiente-



te forma. En el momento de efectuarse la recolección de la sangre mediante una jeringa de la forma que ya indicamos, hicimos caer una gota sobre un porta-objetos, con el cual practicamos varias extensiones y efectuando luego las siguientes reacciones.

Reacción de Quinke: Esta reacción demuestra la existencia de óxidos férricos y ferrosos, pero no es muy sensible.

1<sup>a</sup>) Se hace actuar sobre el preparado fijado por alcohol una solución concentrada de sulfuro de amonio hasta que haya tomado una coloración de verde oscuro a verde negruzco.

2<sup>a</sup>) Se lava rápidamente con agua.

3<sup>a</sup>) Se examina con glicerina conteniendo un poco de sulfuro de amonio. El hierro resalta bajo la forma de gránulos negros o verde negruzco. La reacción se hace debajo de una capa de glicerina a causa del mal olor del  $(\text{S}(\text{NH}_4))_2$ .

En estos preparados puede hacerse proceder a la coloración del hierro, una coloración nuclear como puede hacerse por ejemplo con la hematoxilina, litio, carmín, etc.

El inconveniente de esta reacción es que el sulfuro de amonio da la misma reacción cuando se trata de otros metales, como por ej. plata, mercurio, plomo, etc. pudiendo dar lugar a error en la interpretación.

Reacción del azul de Prusia: (Perls) Esta reacción indica la presencia de hierro resultando negativa para los compuestos de óxido de hierro. Según Perls, los preparados

ya fijados se llevan a una solución diluida de ferrocianuro de potasio del 1 al 2%, durante dos o tres minutos, luego se le hace actuar ácido clorhídrico diluido al  $\frac{1}{2}$ % o 1%. - El pigmento que contiene hierro se colora en azul muy intenso. -

Como se vé, para la demostración microquímica de la hemosiderina pueden servir varios métodos. Los resultados que se obtienen son verdaderos sólo cuando las fijaciones del material se hacen inmediatamente y después de extraído. Para la fijación se puede emplear con grandes ventajas el alcohol, obteniéndose con éste reacciones seguras y claras. - El alcohol con formol, el Meloruro de mercurio son fijadores que poseen un valor inferior al del alcohol. Para evitar errores es necesario utilizar fijadores completamente exentos de hierro, como así también con el agua que se utiliza para el lavado de preparados, o bien para la preparación de reactivos. En nuestras experiencias utilizamos como fijador el alcohol teniendo cuidado de evitar las causas de errores arriba indicados.

En nuestras preparaciones siguiendo la técnica de Perls encontramos también células grandes y placas cargadas de gránulos pigmentarios, pero con la diferencia de que éstos no daban la reacción del azul de Prusia, poseyendo un color negruzco, tratándose, en estos casos de SFe, en corpúsculos negros.

## INVESTIGACION DE LA HEMATOIDINA

La extracción de la sangre se hizo en la misma forma que la indicada para la hemosiderina. Al efectuar coloraciones sobre extensiones de esta sangre y además reacciones sobre una gota de sangre que se colocó sobre un porta-objetos al que se aplicó un cubre-objetos.

En los preparados en fresco se practicó la reacción del  $\text{SO}_4\text{H}_2$ ;  $\text{NO}_3\text{H}$ ;  $\text{NO}_2\text{H}$  y del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , etc. observando mediante el microscopio el cambio de color.

En las extensiones efectuamos coloraciones con azul de metileno, observándolas luego al microscopio.

Observamos en la enorme mayoría de los casos, cristales de hematoïdina, rómbicos, de color amarillado oscuro, corpúsculos amarillo ocre de hemosiderina y células macrófagas de 50 a 100 micrones de tamaño, de núcleo único y grande, con protoplasma cargado de pigmento de la misma coloración ocre.

En conclusión el estudio microquímico nos proporciona un valioso concurso para demostrar la veracidad de los focos hiperémicos, debiéndose sistematizar la investigación de estos elementos si queremos tener una ligera tranquilidad de haber actuado sobre una zona de sangre estancada, que luego el estudio bacteriológico confirmara su etiología.

## CONCLUSIONES GENERALES

- 1º) Mediante el examen directo, comprobamos la presencia del bacilo de Koch, en la sangre proveniente de los focos hiperémicos tuberculosos.
- 2º) Esta comprobación, siguiendo la técnica indicada, se hace muy dificultosa, haciéndose casi imposible emplearla cuando se trata de casos de ósteo-artritis de rodilla, de mal de Pott, etc. es decir de toda ósteo-artritis que no sea de cadera.
- 3º) Que el método de investigación del bacilo de Koch mediante la homogeneización, daría buenos resultados, sólo cuando se tiene plena seguridad de que la sangre a estudiar es pura y exclusivamente; esa sangre negra y espesa del foco tuberculoso, explicándose así el enorme porcentaje de casos negativos registrados en las ósteo-artritis de rodilla y en las afecciones de mal de Pott.
- 4º) Confirmamos clínicamente el polimorfismo del bacilo de Koch, llamando especialmente la atención la presencia de abundantes gránulos alcohol ácido resistentes, los que se presentaron ya sea aislados o bien agrupados.
- 5º) Comprobamos la presencia de cristales de hematoidina y de hemosiderina.
- 6º) La confirmación del bacilo de Koch, empleando para ello el método directo o la presencia de productos de transformación de la hemoglobina, como son la hemoside-

rina y la hematoidina, indican de un modo rápido la forma con que se practicó la intervención quirúrgica de Robertson Lavallo, teniendo por lo tanto, un valor pronóstico.

\*\*\*\*\*  
-----

## B I B L I O G R A F I A

- VON LIGNAC G.O.E.- "Ueber den chemisches und die Biologie des menschlichen Haut-pigmentes" (Virch.Arch.240.Pág. 393).-
- Id.- "Ueber das Hamatoidin und seine Beziehungen zum Blut und Gallenfarbstoff"(Ibid 243, pag. 273).-
- PERLS.- "Nachweis von Eisenoxid" (Virchow Arch.39).-
- QUINCKE.- "Ueber direkte Eisenreaktion" (Arch. fur exp. Path . 37).-
- SUMITA.- "Zur Frage der Eisenreaktion ecc"(Virch.Arch.200)
- E. A. VOTTA.- "Coxalgia.Espina ventosa.Tratamiento quirúrgico por el procedimiento de Robertson Lavalie".-
- ROBERTSON LAVALIE.- "Osteoarthritis tuberculosa.-
- J. CAUSSIMON.- "La recherche du bacille de Koch dans le sang circulant des tuberculeux pulmonaire".
- AUBERTIN E. y FONTAN A.- "Sur un procédé d'inoculation des produits séptiques au cobaye pour le diagnostic de la tuberculose. quelques remarques sur les inoculations de produits bacillifères au cobaye".-C.R.Soc.Biol. Tomo LXXXVIII, 20 Enero de 1923, págs. 118 y 120.
- AGULHOM H. y Frouin A.- Etudes sur les matières grasses du bacille tuberculeux".-Bull.Soc. Chim.Biol.Novembre-Diciembre 1919, I, N° 4.-

- ABENHAUSER.- "Einige Bemerkungen über das Vorkommen von Tuberkelbacillen in Narburger Butter und Margarine.-Inaug. Dissertation. Marburg, 1900.
- ALVAREZ & TAVEL.- "Recherches sur le bacille de Lutsgarten.- Arch. de Physiol norm. et pathol, 1885, N° 7.
- ARLOING & COURMONT P.- "Les cultures homogènes du bacille de Koch et le serodiagnostic de la tuberculose."-Congreso intern. de la tuberculosis. Paris, 1905.
- ARLOING S.- "Cultures homogènes".-Acad. des Sciences.- Mayo 9 de 1898.-
- ARLOING S.- "Agglutination par les sérums spécifiques" Mayo 16 de 1898.
- AUCLAIR .- "L'acide-alcool-résistance, dans ses relations avec l'identité du bacille de Koch. Presse Médicale, 1908.
- BESREDKA & JURILLE F.- "Académie des Sciences, 26 de Mayo de 1931y Annales de l'Institute Pasteur, Novembre 1913, pág. 1069 y 1914 pág. 576.
- BEZANCON.- "L'analyse chimique du bacille tuberculeux et les milieux de culture".- Rev. de la Tuberc. pág.397, 1923.
- BERTHELON ET DELBECQ.- "La présence du bacille de Koch dans le sang des tuberculeux."- Lyon Médical. t. CXXXI, N° 16, pág. 705-13. Ref. Zent. f. g. Hyg. t. VII, N° 1, 1924, pág. 55.
- BEZANCON F. PHILIBERT A. et HANDUROY P.- "Sur la structure des voiles jeunes des cultures de bacilles tuberculeux.- Comptes rend. Soc. Biol, pág. 475-77, 1924.

- BABER.**- "Les corpuscules metachromatiques des bacilles acide-résistants".- C.R. Soc. Biol., 1910.
- BERGERON.**- "La présence du bacille de Koch dans le sang" Thèse de Paris, 1903-1904 -
- BEZANCON Y CHILIBERT.**- "Relation du bacille de Koch et des bacilles acide-résistants".- Cong. Intde la tuberc. Paris, 1905.
- BOTTI A.** - "La méthode de Konrich pour la coloration du bacille de Koch".- Gazzetta degli Ospedali e delle cliniche. Milan. t. XLII, N° 45; Junio 5 de 1921.
- BOUFFE A. & NEGRE L.**- "Sur le rôle des lipoides du bacille de Koch" - V Congreso Nacional de Medicina. Strasbourg, 1923.- Ref. La Presse Médicale, Julio 7 de 1923, pág. 600.-
- BORREL A; BOEZ L. y COULON A.**- "Milieux synthétiques et facteurs accessoires de la croissance pour le bacille tuberculeux. V Congreso Nacional de la Tuberculosis. Strasbourg, 1923.- Ref. La Presse Médicale; Julio 1923 pág 601
- BECLERE.**- "Nouveaux résultats obtenus par l'inoculation" Soc. Méd. des Hop. Paris 14 de 1903.
- BERSZDKA.**- "Culture des bacilles tuberculeux du jaune d'œuf." Annales de l'Inst. Pasteur, 1921, pág. 291.-
- BERGERON.**- "Recherches des bacilles tuberculeux dans le sang".- Thèse, Paris, 1907.-
- BEZANCON & GRIFFON.**- "Culture directe du bacille tuberculeux par l'enrichissement direct du liquide céphalo-ra-



chidien sur le sang gélifié glicérine. C.R. Soc. Biol. 24 de Junio de 1899.-

BEZANCON & GRIFFON.- "Culture directe du bacille tuberculeux sur la pomme de terre emprisonnée dans la gélification glicérinée et sur la sang gélifié".-C.R. Soc. Biol., 4 de Febrero de 1899.

BEZANCON & GRUFFON.- "Culture de bacille tuberculeux sur le jaune d'œuf gélifié. C.R. Soc. de Biol. 3.V. 1903. p. art. IV, pag. 603.-

BEZANCON, GRIFFON Y PHILIBERT.- "Recherches du bacille tuberculeux dans le sang par homogénéisation du caillot.-C.R. Soc. Biol. t. LV. Enero 10 de 1903. pag. 35/7.-

IDEM.- "Causes d'erreur dans le diagnostic du bacille tuberculeux, recherches dans le caillot par l'examen microscopique.-C.R. Soc. Biol. t. LV, Febrero 7 de 1903; pag. 203 y 204.-

BEZANCON & PHILIBERT.- "Recherches expérimentales sur l'inoculation simultanée et du beurre dans la poitrine des cobayes"-Revue de la Tuberculose. Agosto, 1905.

IDEM.- "Basilles héréditairement acido-résistantes et basilles accidentellement acido-résistantes".-C.R. Congreso de la Tuberculosis. Paris, 1905.

IDEM.- "Etude comparée de l'acido-résistant du bacille tuberculeux et des bacilles acido-résistantes" Bull Méd.-Nº 96. 11. XII. 1907 y Bull. de la Soc. d'étud, sur la tuberculose. Diciembre 1907. p. 203.-

IDFM.- "Sur la nature de l'acido-resistants du bacille tuberculeux? C.R. Soc. d'études scient. sur la tuberc. Décembre 1907. Pâg. 214

IDFM.- "Société d'études sci. sur la tuberculose. 12. III. 1924, pág. 32.

IDFM.- "Importance de la notion de densité pour la recherche du bacille de Koch dans les procédés d'homogénéisation des crachats. B. de la S. d'études scient. dans la tuberculose 2. IV. 1911.

BEZANCON F. & CHEVALLEY M.- "Associations microbiennes dans l'infection tuberculeuse". L. Pr. Méd. 7. VII. 23 p. 600.-

BEZANCON M.- "Aspects variés du bacille tuberculeux suivant les milieux de culture". V. Cong. Nac. Tuberc. Strasbourg 1923. L. Pr. Méd. 7. VII. 1923.- pág. 601.-

BUC R.- "Sobre la relatividad del caracter aerobio del bacilo de Koch. C.R. So. Biol. 5. V. 1923. Rev. Sud. Amer. pág. 519. Noviembre de 1923.

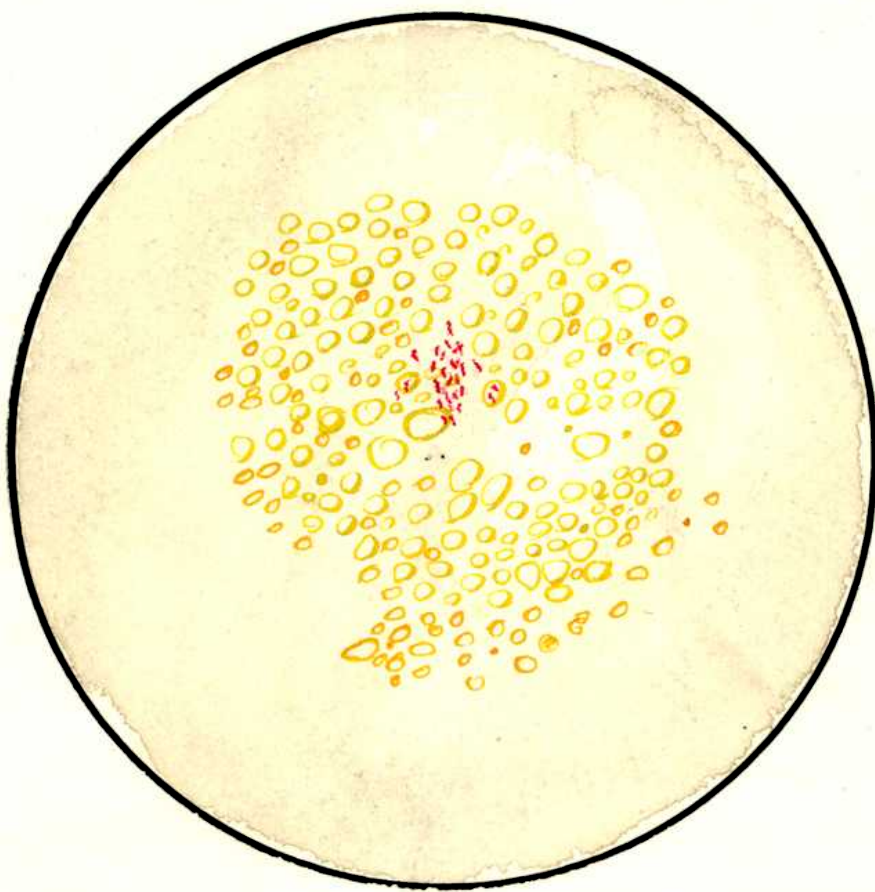
BINOT.- "Sur un bacille para-tuberculeux isolé de beurre" Arch. de Parasitologie. 10. V. 1923. pág. 306.

BOUTIN.- "Les variations morphologiques du microbe de la tuberculose"-Thèse Paris, 1906 Anselin et Houzeau.

BORREL A; BOEZ L. & DE COULON.- "Factores accesorios del crecimiento del bacilo tubercular. C.R. Soc. Biol. Strasbourg, 1923 Junio 8. Rev. Sud. Americana.- Octubre 1923.

BAUVEAULT.- "Etudes chimiques sur le bacille de la tuberculose- Thèse. Paris, 1892.

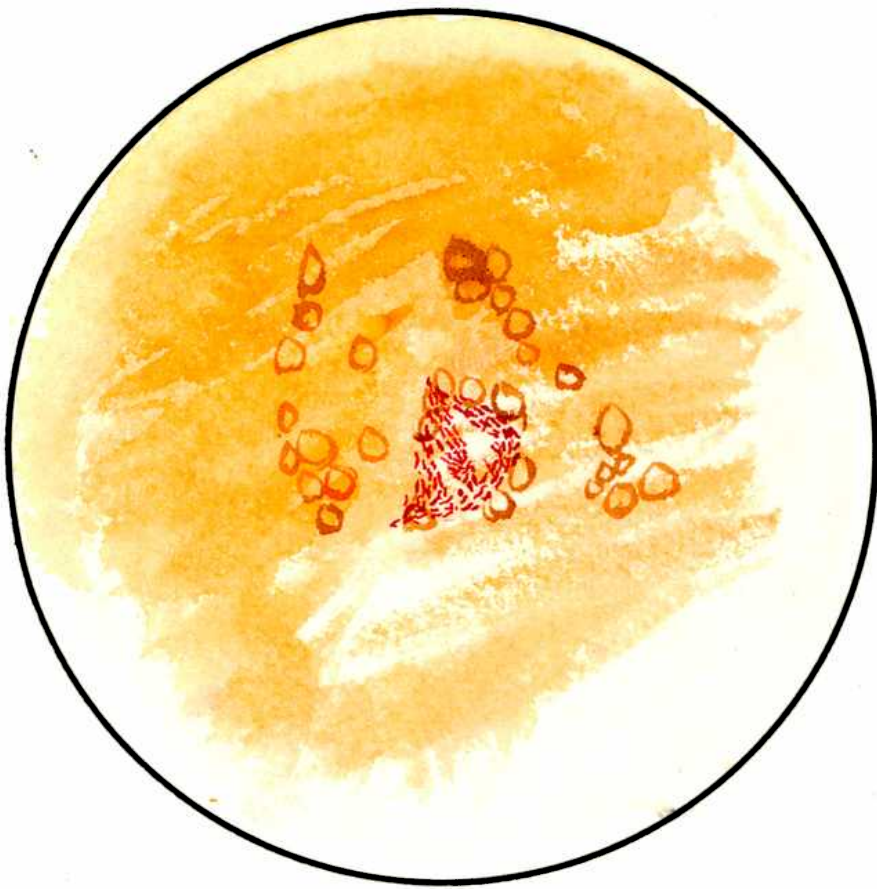
Nº 1



*Bacilos de Koch. (coloración de fondo con ácido picrico)*

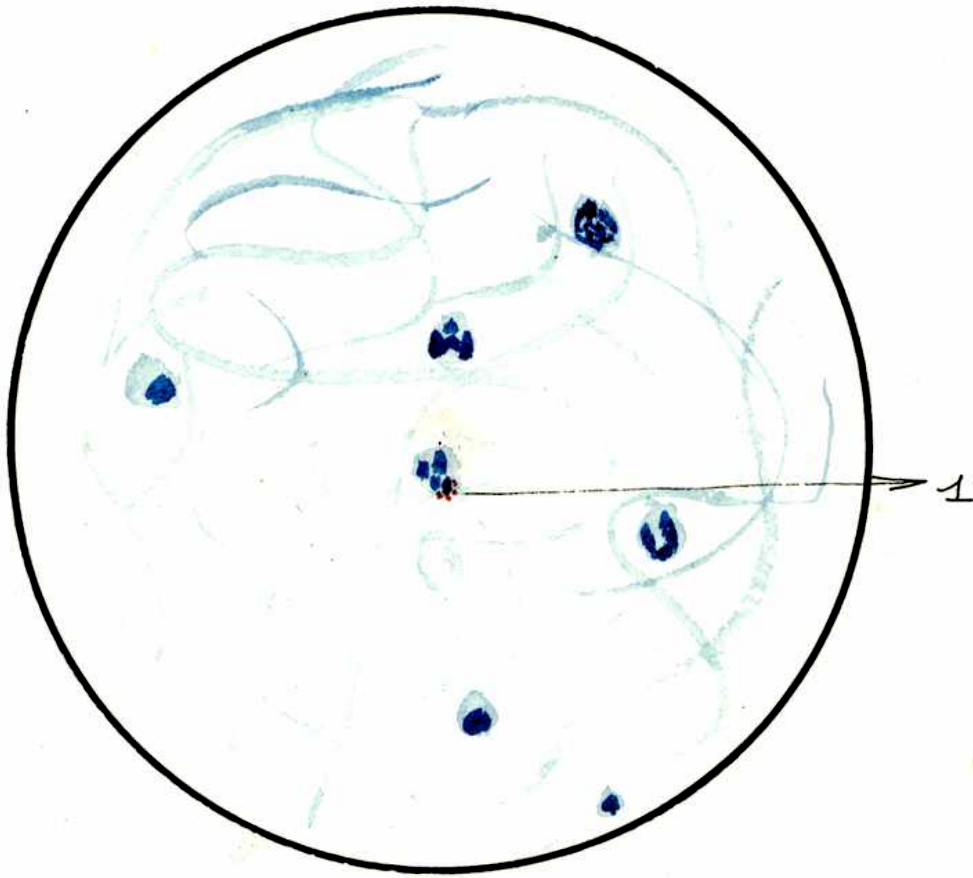
*Homogeneización: por Cassimon. —*

A° 2



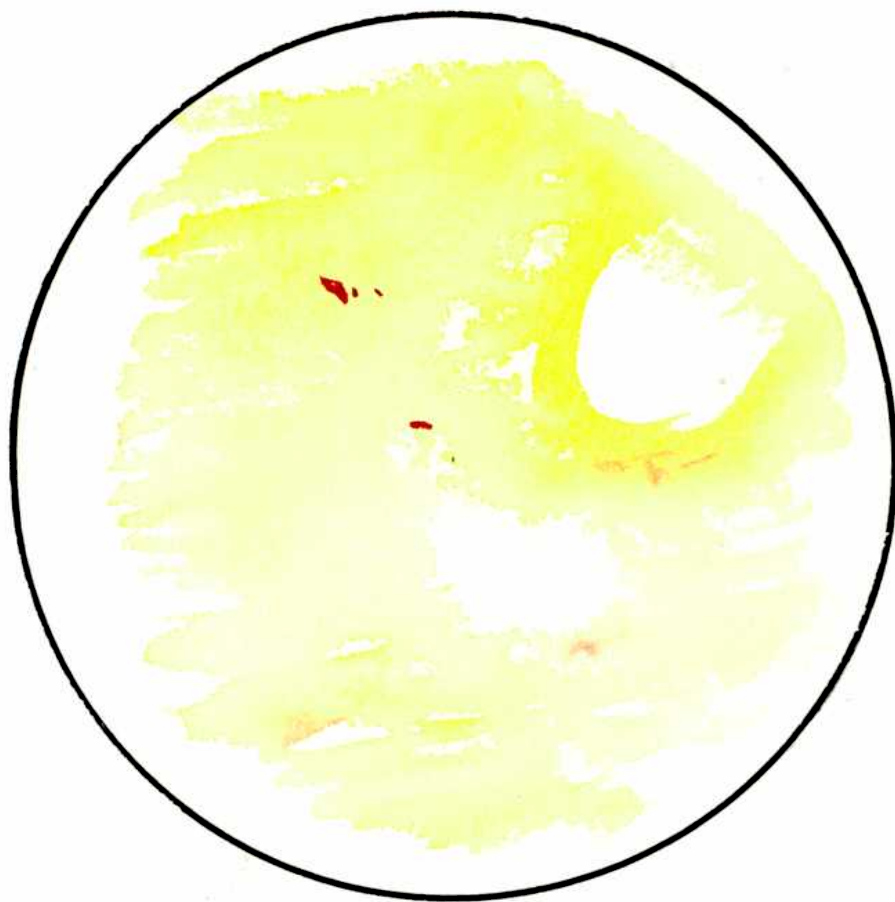
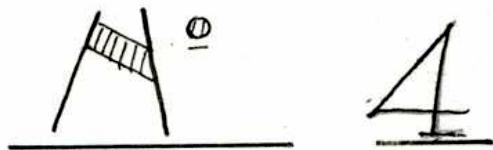
Bacilos de Koch agrupados

Nº 3



A. Polinuclear conteniendo restos de  
bacilos.



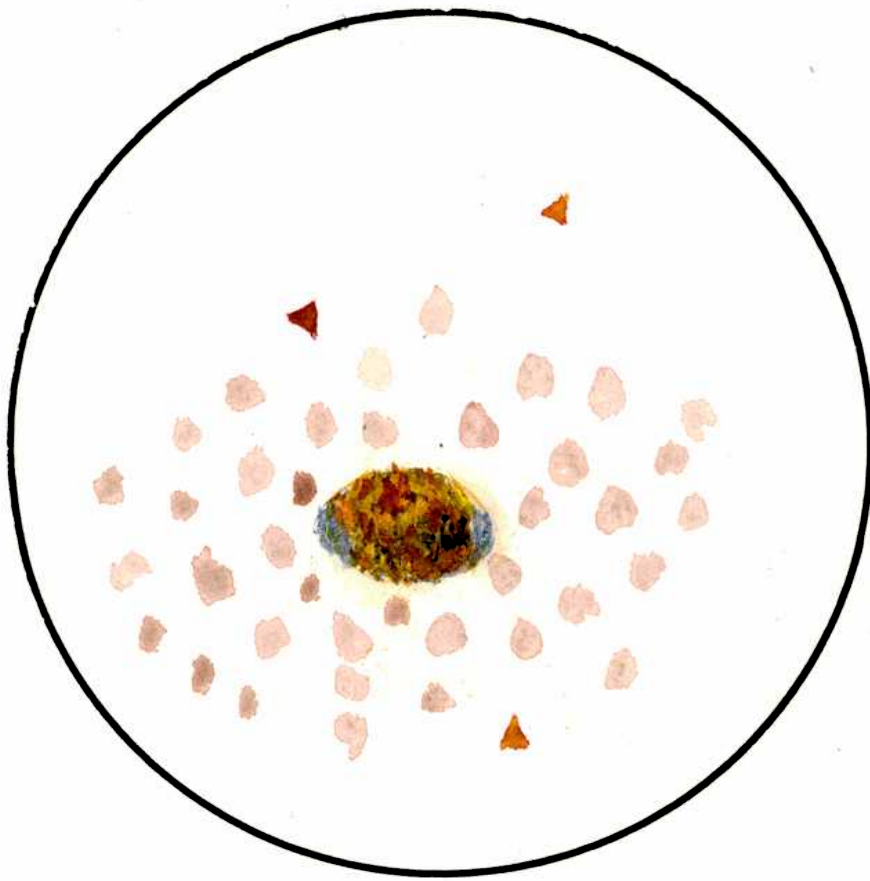


— Coloración de Schvlte y Tigges —

1. — Bacilos de Koch tipo corto homogeneo. —

2. — Granulaciones libres. —

Nº 5



*Célula Macrófago (con gránulos de desintegración  
de la hemoglobina).—*

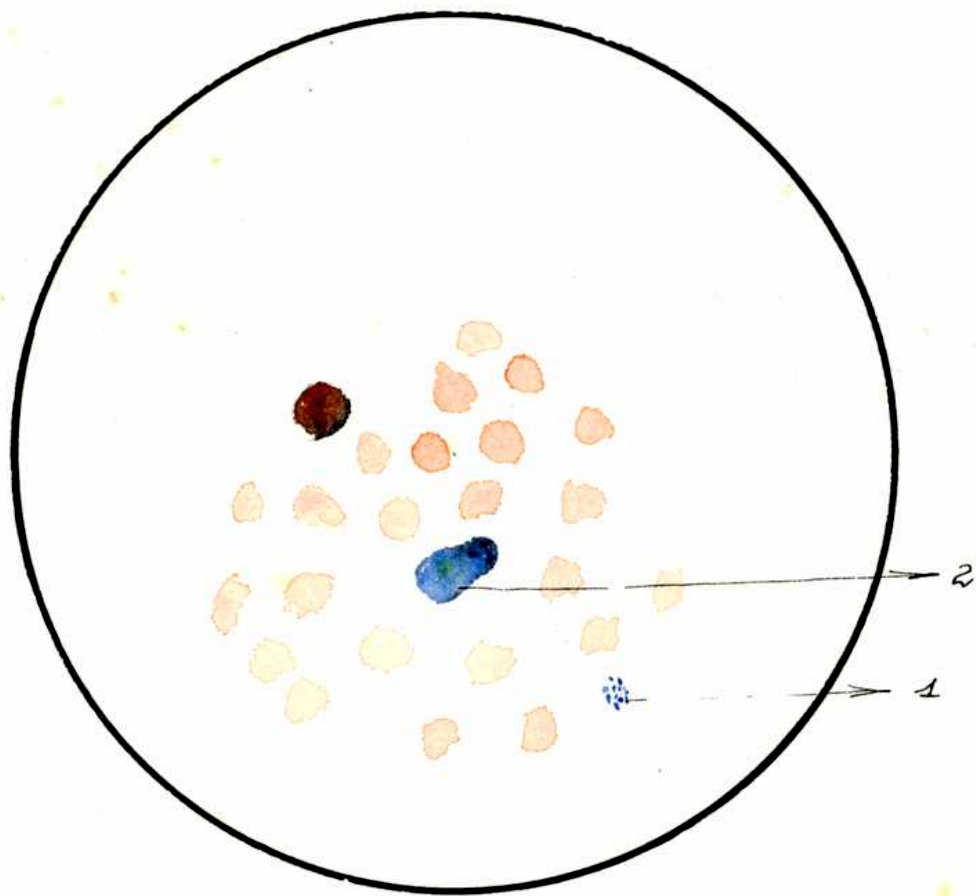
A<sup>o</sup> 6



— Coloreción de Schulte y Tiggles —  
granulaciones alcohol ácido resistentes agrupadas

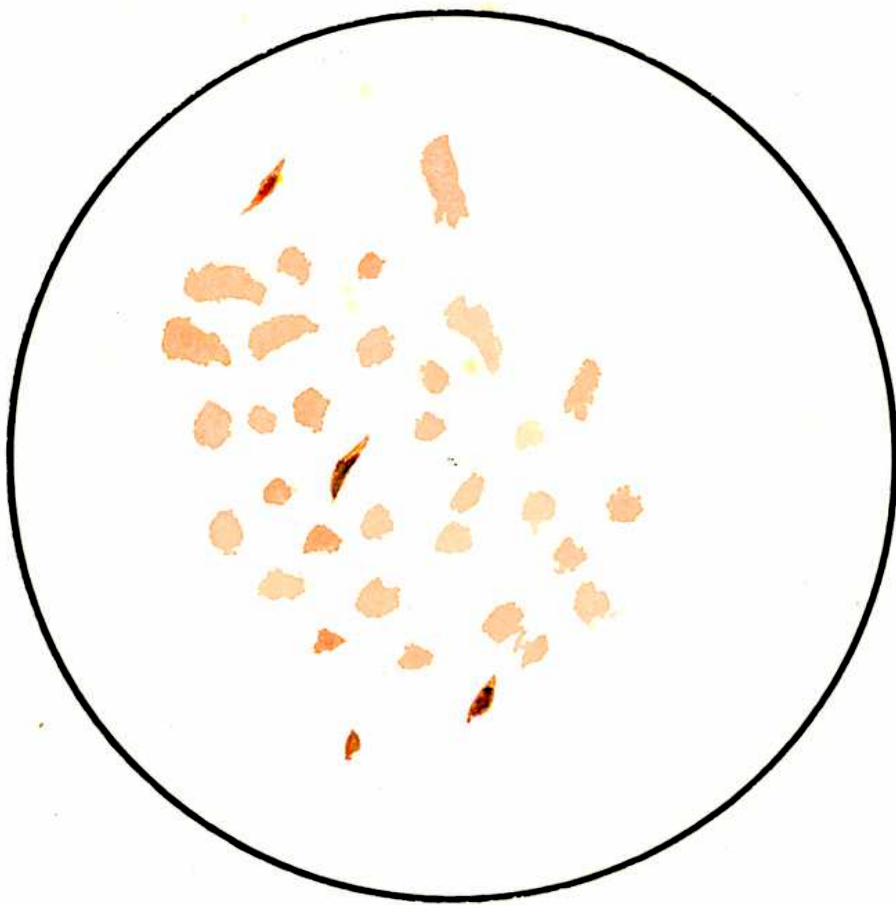
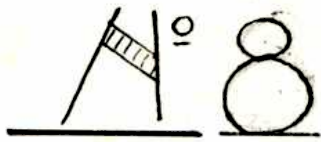


Nº 7



Coloración de Qvincke y Hunter

- 1.- Granulaciones de hemosiderina
- 2.- Placas cargadas " "



Cristales de Hematoidina