

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



CONTRIBUCION DEL LABORATORIO
EN EL DIAGNOSTICO DE LA
TUBERCULOSIS

TESIS

PRESENTADA POR
SARBELIO ECHEVERRIA

EN EL ACTO DE SU DOCTORAMIENTO

San Salvador, Noviembre de 1952

T
616.0756
E18c
1952
F. Q. y Far.

UES BIBLIOTECA CENTRAL



INVENTARIO: 10106951

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector:

INGENIERO JOSE ANTONIO PERLA

Secretario:

Dr. JOSE SALINAS ARIZ

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

Decano:

Dr. FELIX LEON SUNCIN

Secretario:

Dr. LUIS A. AMAYA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

**JURADOS QUE PRACTICARON
LOS EXAMENES PRIVADOS:**

PRIMER PRIVADO:

Dr. Raúl Montoya
Dr. Luis A. Amaya
Dr. Víctor Ortiz

SEGUNDO PRIVADO:

Dr. Julio C. Morán Ramírez
Dr. Félix León Suncín
Dr. Elías Alvarado

EXAMEN PUBLICO:

Dra. Mercedes Martínez
Dr. Raúl Montoya
Dr. Filiberto Alfaro

Nosotros los abajo firmados, Presidente y Vocales que integramos el Tribunal de Doctoramiento Público, en la Facultad de Química y Farmacia, nos hemos reunido en el Decanato de dicha Facultad, a fin de dictaminar sobre la Tesis presentada por el Bachiller Sarbelio Echeverría e intitulada "CONTRIBUCION DEL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS"; y encontrando que dicha Tesis reúne los requisitos exigidos por el Art. 151 de los estatutos universitarios vigentes, la aprobamos por unanimidad de votos la Tesis anteriormente citada.

En fé de la cual firmamos la presente, en la ciudad de San Salvador, a las diez y ocho horas del 8 de Diciembre de mil novecientos cincuenta y dos.

Dr. Raúl Montoya,
Presidente.

Dr. Fiiberto Alfaro,
Vocal.

Dra. Mercedes Martínez,
Vocal.

DEDICATORIA

Dedico el acto de mi Doctoramiento y el presente trabajo:

A la memoria de mi padre

SILVERIO ECHEVERRIA

A mi querida madre

ANGELA v. DE ECHEVERRIA

A todos mis familiares

Con especial aprecio a todos mis Profesores,
compañeros y amigos

PROLOGO

Es innegable que todo sacrificio tiene su recompensa y voy a sintetizar en pocas palabras lo que ardo en deseos de expresarlo. Hace algunos años inicié la ardua tarea de mis estudios profesionales, con el deseo ferviente de salir del nivel común y de prestar mi decidida colaboración en los múltiples problemas sociales que se ciernen sobre la humanidad entera.

A mediados del año de 1950, la Dirección General de Sanidad promovió un concurso de dos plazas para Auxiliares de Laboratorio, y con la fé puesta en Dios, de cristalizar mis ideales en no lejano día, opté por adentrarme en los conocimientos técnicos de tan importante como meritoria labor patrocinada por la O. M. S.; me hice partícipe y después de las pruebas de rigor salí favorecido con el primer puesto, circunstancia que me colocó en un plano amplio de poder adquirir conocimientos y llevarlos en lo futuro al terreno de la práctica. Fué así como bajo la dirección de la técnica bacterióloga Mary Jane Webb, pude darme cuenta de los diversos métodos modernos para la investigación del B. K.

Sobrepasando de las fronteras de mis aspiraciones y haciendo uso legítimo del derecho de iniciativa, decidí, desde entonces, tomar como punto para el desarrollo de la presente tesis, la que se intitula "CONTRIBUCION DEL LABORATORIO EN EL DIAGNOSTICO DE LA TUBERCULOSIS".

En realidad, no es un trabajo que haga gala de sapiencia, pero en el fondo encierra la laboriosidad y el esfuerzo de quien ha querido poner un grano de arena para edificar sobre bases sólidas que lleven en el terreno de la humanidad el material consistente de la "SALUD", que es la fuente de vida y progreso de los grandes pueblos, porque en verdad un pueblo endémico es digno de compasión.

DESARROLLO

- I. — Historia del Mycobacterium Tuberculosis y de la enfermedad.
- II. — Técnica empleada para su demostración. Examen Microscópico directo y concentración. Cultivos. Técnica y medios de cultivo.
- III. — Inoculación en animal sensible.
- IV. — Valoración de los informes del laboratorio.

HISTORIA DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Si bien la tuberculosis existió en los tiempos prehistóricos y su naturaleza infecciosa fué sospechada durante varios años antes de Jesucristo, su agente etiológico no fué conocido hasta que R. Koch descubriera el bacilo en 1882. Muchos de los aspectos microscópicos de las lecciones tuberculosis fueron descritas por Laennec, en 1819 y en 1861 Villemin, demostró que la infección puede ser transmitida de un animal a otro por inoculación de material infeccioso. Sin embargo, fué Koch quien fundó los conocimientos que hoy poseemos y dió los hechos fundamentales e importantes concernientes al bacilo tuberculoso.

El criterio de Koch para el diagnóstico de la tuberculosis fué seguido siempre con ligeras modificaciones. El formuló tres reglas claras y definidas que deben ser cumplidas en orden para establecer un diagnóstico bacteriológico de la enfermedad. En algunas enfermedades criterios adicionales ayudan a juzgar las relaciones de los organismos a afecciones sospechadas y en algunas infecciones no es posible cumplir con esas condiciones. Pero en el diagnóstico de la tuberculosis el cumplimiento de los postulados de Koch, tal como los conocemos, es la prueba concluyente de que el bacilo tuberculoso es la causa de la enfermedad.

MYCOBACTERIUM

Este género incluye un número de especies de bacterias que están relacionadas entre sí, las cuales son más convenientemente consideradas en tres grupos: el primero incluye los bacilos tuberculosos que corresponden a los mamíferos, mycobacterium tuberculosis variedad hominis, mycobacterium tuberculosis variedad bovis y el bacilo tuberculoso de las aves, mycobacterium avium; en el segundo grupo están los bacilos de Hansen o mycobacterium leprae y el bacilo leproso de la rata o mycobacterium leprae murium; en el tercero encontramos el bacilo de Johnes o mycobacterium para tuberculosis y ciertos bacilos ácidos resistentes aislados de un animal juntamente con las formas saprófitas ácido resistentes.

MYCOBACTERIUM TUBERCULOSO

Orden: Actinomycetales.— Familia: Mycobacteriaceae.— Género: Mycobacterium.— Bastoncitos delgados, rectos o curvos, a veces irregulares en sus formas con ramificaciones ocasionales y pequeñas.

Se tiñen con dificultad pero resisten a la decoloración, con ácidos minerales son ácido-resistentes.— Gran positivos, inmóviles.— No forman esporos, aeróbicos.— Varias especies son patógenas para el animal.

TECNICA EMPLEADA PARA LA DEMOSTRACION DEL MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Directo y concentrado.— Cultivos.— Técnica y medios de cultivo.—

Para demostrar bacilos ácido-alcohol resistentes por observación microscópica directa se pueden hacer extendidos de los esputos, seleccionando las partículas gaseosas, necróticas o sanguinolentas de la muestra o se puede utilizar el sedimento después que la muestra ha sido homogeneizada. Los resultados comparativos de los dos métodos ha demostrado que los exámenes directos efectuados por selección de las partes de la muestra da un porcentaje de positivos ligeramente mayor que el extendido del sedimento concentrado y centrifugado. Se obtienen mejores resultados de los exámenes directos, cuando el técnico es experimentado, puesto que por el procedimiento de homogeneización algunos bacilos son dañados por acción química y mecánica y pierden su ácido-resistencia y además quedan muchos bacilos en el líquido sobrenadante utilizando la centrifugación a 3000 RPM.

Trabajando con centrífugas de mayor número de revoluciones se ha visto que la concentración da mejores resultados, pero ellas no son empleadas en algunos laboratorios bacteriológicos. Sin embargo la diferencia es tan pequeña entre los resultados de los dos métodos que permite la elección de la técnica de acuerdo a la organización en el laboratorio.

Los cultivos y la inoculación al animal deben practicarse con todas las muestras, agregadas al frotis, a causa de que este método no es sensible lo suficiente y para comprobar que los ácido-resistentes observados son bacilos tuberculosos. Cuando por alguna razón se hace solamente frotis, no hay por qué realizar la concentración química de la muestra. La única razón para practicarla es con el objeto de destruir los organismos contaminantes que se encuentran presentes en forma que la muestra pueda ser empleada para el cultivo o para la inoculación del animal. Cuando la muestra no será cultivada el examen directo puede ser practicado fácil y rápidamente, en general con buenos resultados. Para los aislamientos primarios el cultivo es superior a la inoculación animal para descubrir la presencia de pequeñas cantidades de bacilos. El método de los cultivos descubre no solamente pequeños números de bacilos virulentos sino también aquellos de baja o poca virulencia en tanto que la inoculación animal sólo demuestra la presencia o ausencia de gran número de bacilos ácido-resistentes virulentos. El cultivo requiere menor tiempo, es relativamente simple y menos costoso. Los

resultados positivos son obtenidos por los cultivos entre dos y seis semanas y con un pequeño entrenamiento el técnico puede aprender a distinguir las colonias típicas del bacilo tuberculoso de las que corresponden a los ácido-resistentes saprófitos.

Sin embargo, algunas colonias del bacilo tuberculoso son atípicas en su aspecto morfológico y algunos aprofitos son similares a las formas patógenas en cuanto a las colonias. Cuando aparecen colonias atípicas de bacilos tuberculosos que no pueden ser identificadas por cultivo, el test de virulencia debe ser realizado por inoculación animal. Todos los cultivos sospechosos de ser ácido-resistentes deben ser observados al microscopio para su confirmación.

Cuando se han practicado inoculaciones con todos los cultivos que no aparecen como típicos, existen pocas probabilidades de error con el método de los cultivos.

En oportunidades los cultivos son típicos de bacilos tuberculosos en el aspecto de las colonias, pero son avirulentos o de poco poder patógeno.

Cuando los resultados de laboratorio no coinciden con los hechos clínicos y radiológicos se deben enviar muestras al laboratorio para los test de cultivo y virulencia. El problema más difícil de los cultivos es la eliminación de los organismos contaminantes.

Cuando los cultivos se contaminan se hace necesario repetirlo con nueva muestra.

MORFOLOGIA Y COLORACION

El bacilo tuberculoso es delgado, algunas veces ligeramente encorvado en bastoncitos de 2 a 4 micras de largo por 0.3 a 1.5 micras de ancho.

Ellos se encuentran individualmente, pero a menudo pueden encontrarse en pequeños grupos, algunas veces en masas compactas en las cuales el bacilo no puede distinguirse individualmente. El bacilo de variedad humana tiende a ser, algunas veces, más largo y más delgado que el del bovino, pero la morfología de ambos es variable y no puede hacerse ninguna distinción apoyándose en estas bases. Las formas bacilares son generalmente retenidas de los tejidos, algunas veces son vistas en cultivos en formas filamentosas más largas, juntamente con células hinchadas o ejemplares agrupados pareciéndose al bacilo diftérico. Formas ramificadas se presentan en los cultivos de bacilo tuberculoso tipo aviario, pero raramente se ven en los cultivos de bacilos tuberculosos de los mamíferos. La ocurrencia de formas filamentosas y verdaderas ramificaciones indican la relación estrecha de ese bacilo a los hongos más elevados: de aquí el nombre de *Mycobacterium* y la coloración de estos microorganismos juntamente con el bacilo diftérico en el orden de los Actinomycetales.

El bacilo tuberculoso no es móvil y no forma esporas y produce una substancia capsular en cultivos artificiales, particularmente cuando

crece sobre medios de suero de estructura granular de las células individuales es marcada. A menudo aparecen vacuolas en abundancia a aumentar a las células teñidas la apariencia de una cadena de cocos. El significado de los pequeños y profundamente coloreados cuerpos, algunas veces observados en el interior de las células no es claro, no demuestran la tenaz resistencia característica de las esporas.

El bacilo tuberculoso no puede ser coloreado por los métodos usuales de coloración que son efectivos para otras bacterias; para colorearse este bacilo ofrece una marcada resistencia a la penetración de tintas adentro de su célula. Esta resistencia ofrece el bacilo a las tintas, se asocia con la presencia de cantidades relativamente grandes de cera insaponificable.

Las células pueden, sin embargo, ser coloreadas en dos o tres minutos por emisión de vapores con carbol fucsina o por prolongada (24 a 36 horas) exposición del colorante a la temperatura del cuarto. Una vez teñido el bacilo ofrece dificultad para su decoloración y al mismo tiempo resiste la coloración del alcohol y soluciones diluidas de ácidos minerales; por esta razón son llamados "ácido-resistentes".

FISIOLOGIA

El bacilo tuberculoso es un aerobio y no crece bajo condiciones anaeróbicas. Las variedades mamíferas crecen mejor a 37° C. debajo de 30° C. o sobre 42° C. La temperatura óptima para el tipo aviario, sin embargo, es 40° C. El crecimiento es relativamente despacio, de 4 a 6 semanas son requeridas generalmente para obtener un abundante crecimiento. Aunque aparecen diminutas colonias a los 8 o 10 días. La mayor parte de cepas de tipo aviario adaptan sobre los cultivos de medios artificiales y en proporción de tiempo son capaces de crecer más rápidamente mientras que los otros crecen lentamente.

El bacilo tuberculoso es difícil de cultivar cuando es la primera vez que se aísla. Un medio de sangre coagulada por condensación fué usado por Koch, y este medio aun se toma como uno de los más satisfactorios. Para su aislamiento también son usados, cuando es la primera vez que se aísla, que contienen huevos ya sea la yema y la clara combinadas, glicerina y algunos colorantes; el medio de huevos de Dorcets está simplemente compuesto de huevos enteros mezclados con un poco de agua y coagulados en forma de bicel por condensación. El medio de Petroff, que es uno de los más extensamente usados, consiste en una base de infusión a la cual se han agregado huevo, glicerina y violeta de genciana y se ha esterilizado por condensación. El medio de Lowenstein es entre ellos el más complejo y contiene huevos, harina de patata, infusión de médulas de huevo, citrato, glicerina y asparragina. Patatas gliceradas son usadas por los trabajadores franceses. El medio de Corpers es patata glicrolatada con la modificación de que las piezas de patata son remojadas por un corto tiempo en una solución de cristal

violeta antes de la esterilización con la solución de glicerina. El colorante en este medio y el de Petroff sirve para inhibir el crecimiento de bacterias contaminantes.

La variedad humana de bacilo tuberculoso crece más abundantemente sobre todos estos medios que como lo hace la variedad bovina y por esta razón se le ha llamado con el término "Eugónico" y el del tipo bovino "Dysogónico". Estas dos variedades también difieren en que el glicerol es marcadamente favorable para el crecimiento del tipo humano pero no tiene el mismo efecto para el tipo bovino. No es conocido por qué la glicerina ejerce este efecto favorable; se intenta sustituirla por un compuesto relacionado o relativo a la glicerina tales como el isopropyl alcohol, propyl alcohol, glycol, trimetileno glycol e inositol sin haber obtenido éxito. La glucosa, sin embargo, actuó en muchos de estos intentos de la misma manera que el glycerol. Las yemas de huevo se dice que contienen un líquido que es factor de crecimiento pero esto parece ser para estimular en vez de ser esencial para el crecimiento. La tiamina pyridoxina y riboflavina no estimulan el crecimiento. El crecimiento ocurre mucho más prontamente y sobre medios mas simples después del primer aislamiento. El bacilo tuberculoso humano crece bien sobre agar nutritivo o caldo conteniendo glicerina (2 a 5%) y ha sido cultivado en una variedad de soluciones sintéticas. Una de las mejor conocidas entre éstas es el medio sintético de Long's, el cual contiene glicerina asparragina, citrato y sales inorgánicas. Dubois y sus compañeros de trabajo han encontrado que el crecimiento es facilitado y ocurre difusamente a través de medios líquidos en presencia de ciertos líquidos solubles en el agua. Un medio conteniendo esparragina, glucosa, fosfatos, citratos, albúmina, suero bovino, sulfato de magnesio y un líquido comercialmente designado Tween 80 (un poly oxyetileno derivado del mono oleato de sorbitan) dará crecimiento visible de la variedad humana del bacilo tuberculoso dentro de dos semanas el medio se vuelve inhibitorio con el tiempo debido a la actividad de la lipasa contaminante de las preparaciones de albúmina la cual libera ácido oleico con concentraciones bacterióticas de Tween 80; el efecto puede ser eliminado por el uso del suero albúmina bovina cristalina, la adición de 0.01% de sodio flour-hídrico, etc. El tipo bovino crece pobremente o no tiene crecimiento sobre todos los medios y solamente se beneficia ligeramente por la presencia de la glicerina. El tipo aviario del bacilo tuberculoso, sin embargo, crece mucho mejor que el tipo humano después de transferirlo un poco y se puede tener un buen crecimiento sobre agar nutritivo con ausencia de glicerina. Como el tipo humano, el bacilo aviario crece mucho más profusamente en presencia de la glicerina. Estas diferencias de cultivos en los tres tipos de bacilos tuberculosos son de poca significancia en su temprana diferenciación; es necesario que se hagan varias veces durante un período de meses antes de que su diferencia sea evidente. Las reacciones bio-químicas del bacilo tuberculoso no han sido estudiadas en toda su extensión.

El crecimiento ocurre en leche, pero ningún cambio visible se produce; se dice que no se forma índol. No se desarrolla acidez en caldos azucarados, pero se ha encontrado por métodos analíticos que la dextrsa, arabinosa y algunas veces la sucrosa son utilizadas por el bacilo mientras que la lactosa no. Sea que los procesos de oxidación son completos o sea que los ácidos formados son neutralizados por el amonio liberado, no es aun conocido.

En caldo con glicerina, los cultivos del tipo bovino se vuelven ligeramente ácidos. Se ha reportado que la fuente de alcalinidad, los constituyentes del medio nitrogenados y la acidez se producen de la glicerina siendo oxidada después. Todas las graduaciones intermedias ocurren, sin embargo, y ninguna diferenciación es posible entre los dos tipos basándose en estas bases.

COMPOSICION QUIMICA

La composición química del bacilo tuberculoso ha sido más intensivamente investigada que la de cualquiera otra bacteria.

Estos bacilos son de particular interés en su afinidad por su alto contenido de substancia lipoides las cuales pueden formar el 40% de peso seco.

Las proteínas, una considerable proporción de las cuales son núcleo-proteínas, forman alrededor de la mitad de peso seco y los polisacáridos son encontrados en una cantidad relativamente pequeña.

Los lípidos han sido estudiados en toda su extensión por Anderson y sus colaboradores.

Además de la grasa neutra, dos tipos generales de substancias pueden ser distinguidos:

a) Fosfolípidos, conteniendo ácidos grasos saturados y no saturados incluyendo los bien conocidos ácidos palmíticos, linoleico y linolénico juntamente con dos ácidos peculiares del bacilo tuberculoso, el ácido phthoico, isomérico con el ácido cerótico y el ácido tuberculoesteárico isomérico con el ácido esteárico y ópticamente inactivo.

b) Una cera ácido resistente, conteniendo polisacáridos hidrolizados a la manosa, arabinosa y galactosa, una cera blanda la cual es un complejo glicerado y una cera insaponificable (ácido resistente) hecha de alcohol elevado e incluyendo un alto peso molecular de ácido hydroxymethoxy saturado, al cual se le da el término de ácido micólico, un elevado alcohol designado, pthioserol, y un ácido graso levógiro, el ácido mycorésico.

Algunas de estas substancias parecen ser fisiológicamente activas.

La cera ácido resistente insaponificable aparentemente estimula la multiplicación de los tejidos conjuntivos celulares sin diferenciación y el ácido phthoico, induce a una proliferación de células epitoloides. Si ellos son inmunológicamente activos es cosa que no está clara. Un

pigmento amarillo es encontrado en la grasa neutra el cual es designado phthiocol y es una hydroxynaphtha quinona, la cual puede ser reversiblemente reducida a una potencia relativamente baja.

Mezclada de polisacáridos conteniendo substancias inmunológicamente activas e inactivas han sido aisladas del bacilo tuberculoso o de los mamíferos pero su significado no se ha comprendido. Los constituyentes proteínicos de las células parecen ser inmunológicamente los más importantes y han sido estudiados en conexión con la preparación y actividad de las tuberculinas las cuales serán esterilizadas más tarde en otra sección.

RESISTENCIA

Aunque muchos tienen el mismo grado de resistencia al calor como las células vegetales de otras bacterias, los bacilos tuberculosos son relativamente de alta resistencia al desecamiento, desinfectantes químicos y otras influencias mortales que los rodean, lo cual es muy probable como una consecuencia de su contenido de cera.

En esputos putrefactos el bacilo puede permanecer viviente durante semanas y meses y en esputo ya seco guardado en un lugar oscuro y fresco puede vivir alrededor de seis u ocho meses.

En el esputo que está completamente seco, como las partículas son capaces de flotar como polvo en el aire, pueden ser éstas infecciosas durante ocho o diez días. En el esputo disecado los bacilos pueden vivir a 100 C. durante una hora pero son matados por el procedimiento usual y por calentamiento húmedo. El fenol penetra en el bacilo lentamente y una solución al 5% requiere 24 horas para matar el bacilo en el esputo. La acción de otros desinfectantes es similarmente retardada y se puede notar que los ipocloritos casi no tienen efecto sobre esta bacteria. El bacilo tuberculoso, sin embargo, es rápidamente destruido por exposición directa a la luz del sol; los cultivos son destruidos en dos horas pero en el esputo pueden sobrevivir 20 o 30 horas, a exposición directa.

VARIACION

La variabilidad del bacilo tuberculoso ha sido estudiada extensivamente, en particular en los años recientes, pero con resultados inconclusos. Los variantes de las colonias, opinan algunos, que son análogos a los variantes S. y R. de otras bacterias, los cuales han sido observados, pero algunos investigadores han dicho que el tipo S es el más virulento y otros dicen que la virulencia y la morfología de las colonias son independientes.

Puede notarse que la morfología de las colonias del bacilo tuberculoso es hasta cierto grado una adaptación pasajera a las resistencias

y condiciones que los rodean y una pronta alteración de la apariencia de las colonias resulta al transferirlas a diferentes medios. Por ejemplo Steenken ha observado que las colonias que crecen en extracto etéreo de yema de huevo eran lisas y marcadamente diferentes del tipo usual de colonias pero el efecto es sólo físicamente temporáneo; las condiciones de la variación S=R en el bacilo tuberculoso nunca estuvieron tan claras como ahora.

Bacilo Calmette. Guérin, una cepa bovina del bacilo tuberculoso fué vuelta completamente sin virulencia por Calmette, quien cultivó esta cepa durante largo tiempo (230 pasos en 13 años) sobre el medio de patata glicerolada con bilis.

Esta cepa es designada como B. C. G. (Bacilo Calmette Guérin) y ha sido de particular interés en conexión con la inmunización activa contra la tuberculosis. La naturaleza del cambio el cual resultó en la pérdida de virulencia es completamente desconocida.

La pérdida manifiesta es permanente y la virulencia no reaparece al transferirse sobre medios ordinarios. Petroff, sin embargo, ha separado las variantes "Aspera" y "Lisa" del B. C. G. y la variante lisa manifestó virulencia para el cobayo (cuyo).

Ciclos de vida.—Las tendencias pleomórficas del bacilo unidas con la presencia de bacilo no ácido resistentes en el cultivo joven y los elementos granulares descritos por Muchk, han sido interpretados por un número de investigadores como indicativos de una sucesión cíclica de tipos morfológicos o vida cíclica a través de la cual este bacilo vive como se ha señalado en un capítulo anterior; la evidencia para tal desenvolvimiento cíclico no es definitiva sino que es un asunto de interpretación.

Ya sea que las células hinchadas, desfiguradas, las formas filamentosas y ramificadas y los elementos granulares tales como los descritos por Muchk, están por ser considerados como formas reproducidas sexualmente gonídias, si se gusta o como productos de cambios degenerativos; es puramente asunto de opinión que estas evidencias objetivas tan pequeñas no apoyan la suposición de un ciclo complejo de vida en el desarrollo del bacilo tuberculoso.

FORMAS FILTRABLES

Algunos asocian el concepto del ciclo de vida con la existencia de una forma filtrable de bacilo tuberculoso o "Ultravínis". parece haber una pequeña duda de que algunos cultivos o preparaciones de bacilo tuberculoso contienen formas que pueden atravesar los filtros de porcelana no pulida o también los diacetomacerus (filtros fabricados de tierra de infusorios), pero ya sea que estas formas filtrables se consideren como diminutos bacilos o fragmentos de bacilo con un poder de regeneración o ya sea que ellos representen una "fase" distinta en la historia de la vida de los microorganismos, son cosas que están por determinarse.

PATOGENICIDAD PARA EL HOMBRE

En los Estados Unidos en 1945 se encontraron 106,716 casos de todas las formas de tuberculosis y de éstas, 65,843 fueron casos de tuberculosis pulmonar. La tuberculosis está entre las tres primeras causas principales de mortalidad; ella arrebató relativamente una gran porción de vidas cuyas edades están comprendidas entre los quince y los cuarenta y nueve años de edad y retiene el primer lugar en un individuo cuya edad oscila de quince a treinta y cuatro años; un segundo entre los de treinta y cinco a treinta y nueve años y un tercero entre los cuarenta y cuarenta y nueve años de edad.

En los años de 1939 a 1941 se considera el 10.4% entre los enfermos (hombres) blancos; un 22.9% de mujeres enfermas blancas y un 28.8% de hombres enfermos, no blancos.

La tuberculosis es claramente una enfermedad más mortal del género humano.

El bacilo tuberculoso de los mamíferos, variedades humanas y bovina, son patogénicas para el hombre. El tipo humano es prácticamente siempre el responsable de la tuberculosis pulmonar en los adultos y es también la usualmente encontrada en los niños, pero es más a menudo encontrada en infecciones de otros tejidos.

Más de la mitad de los casos de adenitis cervical y de tuberculosis abdominal en los niños son infecciones debidas al bacilo tuberculoso bovino y ha sido estimado (1910) que este tipo fué el responsable del 6 al 10% de las muertes de tuberculosis en niños tiernos; el porcentaje es probablemente ahora más bajo como resultado de la incidencia decreciente de tuberculosis en el ganado de este país. La tuberculosis bovina es una enfermedad que no se le da mayor importancia en los adultos, pero sí es un asunto serio en los niños menores de cinco años de edad.

Infecciones mezcladas con los tipos de bacilo tuberculoso han sido reportadas, pero son raras.

El bacilo tuberculoso de las aves prácticamente no es patógeno para el hombre aunque algunos casos de infección humana, incluyendo tuberculosis pulmonar, han sido reportados. Algunos han supuesto que la enfermedad de Hodgkins, una inflamación granulomatosa de los tejidos linfadenoides del cuerpo, es una infección debida al bacilo tuberculoso de las aves, pero estas apreciaciones no son verdaderas.

MUESTRAS PARA EL EXAMEN

En todas las lesiones tuberculosas el bacilo está o ha estado presente y el material que se elimina de ellas debe ser examinado investigando bacilos tuberculosos. Cuando se sospecha una tuberculosis pulmonar se deben enviar esputos al laboratorio, contenidos gástricos, hisopos laríngeos para practicar en ellos el examen bacteriológico.

ESPUTOS

El examen de esputos es el procedimiento de elección a causa de su simplicidad y falta de molestias para el enfermo. El paciente debe ser instruido para que enjuague su boca perfectamente al levantarse por la mañana y deposite el esputo directamente en el recipiente estéril suministrado por el laboratorio. Todos los esputos deben ser juntados en el recipiente durante 24 horas.

Cuando es escaso, se deben juntar muestras de 28 y 72 horas. Una media onza (28 — 35 gms.) o más debe ser enviada al laboratorio. El paciente debe ser instruido para que deposite esputos y no saliva. Será necesario explicar al paciente qué es el esputo y el mecanismo de la expectoración. Resultados positivos no pueden ser esperados de la saliva y de las secreciones nasales. Puesto que los bacilos son a veces expectorados periódicamente se deben enviar muestras en serie, habitualmente de 3 a 5 muestras para enviar al laboratorio. Cuando la primera y segunda muestras son positivas, la recolección de muestras debe ser suspendida hasta después de iniciado el tratamiento, puesto que el diagnóstico ha sido establecido.

Habitualmente las muestras son enviadas después que el tratamiento ha empezado, cada mes, con el objeto de chequear el pronóstico.

Cuando el resultado de los esputos es persistentemente negativo o cuando el paciente es incapaz de eliminar material, entonces se recomienda el lavado gástrico o bronquial. Se deben tomar dos muestras dentro de una semana y cuando son negativas, si es posible, una tercera.

LAVADO GASTRICO

Es preferible administrarlo estando el paciente en cama poco después que despierte por la mañana. Cuando esto no es posible, lo que es corriente cuando no está hospitalizado, la aspiración del contenido del estómago debe hacerse dentro de una hora después que el paciente se ha levantado. Debe ser instruido en el sentido de que haga el menor ejercicio posible y que no coma ni beba hasta que la muestra gástrica sea tomada a causa de que el estómago puede vaciarse solo y los esputos y secreciones juntados durante la noche se pierden. Todos los materiales utilizados para hacer la extracción del contenido gástrico deben ser perfectamente limpios y estériles. El lavado gástrico debe ser practicado utilizando una sonda duodenal (Levine) lubricada con aceite gelatinoso. Debe pasarse por la nariz o boca del paciente hasta el estómago. Cuando el tubo alcanza el fondo del estómago se introduce una pequeña cantidad de agua destilada con una jeringa de 25 a 30 cc., en el otro extremo del tubo. El contenido del mismo a continuación es aspirado y transferido a un recipiente estéril. Otro método para obtener muestra gástrica es utilizando un tubo de goma de 7 mm.

de diámetro, con un extremo cerrado y una hendidura lateral. El extremo abierto del tubo se conecta a un irrigador u otro recipiente que tenga una salida en el fondo. Se colocan alrededor de 200 cc., de agua destilada estéril en el irrigador o recipiente.

El tubo de goma se ha cerrado antes con un clamp que es aflojado después que el tubo ha pasado a través de la boca del enfermo y alcanzado el fondo del estómago. Se puede dejar correr la mayor cantidad de agua dentro del estómago sin llegar a vaciar el recipiente y así no cortar el sifón. En seguida es bajada del nivel del estómago. El agua ayuda a lavar las mucosas y secreciones del estómago.

Es sabido que algunas muestras de jugo gástrico tienen un efecto bactericida sobre el bacilo tuberculoso. La inhibición parece variar de intensidad con el número de bacilos presentes, tiempo de contacto, temperatura, por las cualidades inherentes al jugo gástrico mismo. Espustos con bacilos virulentos después de incubación en jugo gástrico normal durante 10 ó 12 horas a 37 grados c., muestran que esos bacilos se han convertido en no patógenos para el cobayo y no se recuperan de sus órganos en la autopsia.

El tiempo de recolección de la muestra hasta su cultivo en el laboratorio es raramente menor de 24 horas y habitualmente mayor. Esto representa un problema en el laboratorio, puesto que el tiempo es amplio como para algunos factores inhibidores; en algunos jugos gástricos afectan al bacilo y detienen el crecimiento dando por consiguiente resultados negativos y falsos. Es imprescindible que las muestras gástricas sean refrigeradas y enviadas lo más pronto al laboratorio. Un aumento en el número de resultados positivos puede ser obtenido por el agregado de 1.5 cc. de una solución a 40% de fosfato dibásico de sodio, a cada recipiente antes de la esterilización. Esto resulta suficiente para neutralizar aproximadamente 45 cc. de ácido clorhídrico n/10, y puede eliminar entonces, parcialmente, resultados negativos falsos.

LAVADO BRONQUIAL

Esta muestra puede ser tomada en cualquier momento que el paciente se encuentre en la clínica. Tiene la ventaja de que no requiere un momento especial para tomarlo como sucede con el contenido gástrico, en su práctica, y como menos molesto para el enfermo. El procedimiento consiste, primero, en anestesiarse la faringe y el árbol traqueobronquial con una solución al 4% de cocaína o pantocaína. A continuación se instilan 24 cc. de agua destilada estéril, tibia, a través de la glotis en la tráquea y bronquios. Después de retenerla de 2 a 3 minutos para movilizar las secreciones bronquiales por el paciente, éste es instruido para que tosa y expectore dentro de un frasco estéril. Cuando la primera muestra es negativa debe repetirse la operación.

HISOPO LARINGEO

Otro aspecto para obtener muestras cuando el paciente es incapaz de eliminar esputos y puede ser igualmente practicado en cualquier momento que el paciente se encuentre en la clínica. Sin embargo, la técnica no se ha generalizado a causa de las personas no tienen experiencia para realizar la operación correctamente y entonces la muestra no tiene valor. Pero cuando las muestras son correctamente tomadas se pueden obtener buenos resultados. Para preparar los hisopos se emplea un alambre que sea suficientemente flexible (que se curvee dentro de un tubo de vidrio), por supuesto sin romperlo, pero que no lo sea tanto que llegue a doblarse cuando se toma la muestra. El alambre es cortado en una extensión de 200 mm. y la punta se dobla aproximadamente a 15 ó 20 mm. del extremo en un ángulo de 150 grados. Lo que resta del alambre es curvado y la extremidad absorbente, de manera de confeccionar un hisopo. Este debe ser pequeño para que entre fácilmente en la laringe del paciente y debe estar bien asegurado sobre el alambre para que no se desprenda en el momento de tomar la muestra. El alambre debe estar lo suficientemente curvo, de manera que el hisopo no toque el fondo de la lengua o de la laringe, pues tocando cualquiera de ellas se cierra la tráquea con la epiglotis y el hisopo penetra en el esófago en vez de la laringe.

El hisopo es preparado para el uso esterilizándolo en un tubo de vidrio tapado con algodón. Una solución al 10% de fosfato trisódico se debe colocar en otro tubo, donde se coloca el hisopo después que la muestra ha sido tomada. El procedimiento para tomar la muestra es el siguiente: la persona que toma la muestra debe estar bien protegida de la tos del paciente y debe llevar un espejo frontal en forma de iluminar el fondo de la garganta del paciente. Con una gasa estéril se toma la lengua con la mano izquierda y se saca lo más posible y con la mano derecha se toma el hisopo del tubo y se introduce el extremo del mismo en la laringe. Cuando se hace apropiadamente se produce de inmediato el reflejo de la tos que siembra el algodón con bacilos. Se retira el hisopo y se coloca en el tubo al que se agregan 2 cc. de la solución estéril al 10% de fosfato trisódico. Esto previene que la muestra se saque y al mismo tiempo destruye los organismos contaminantes, en tal modo que los medios de cultivo puedan ser directamente sembrados sin tratamiento ulterior.

ORINA

Las muestras deben ser juntadas en un frasco grande estéril durante un período de 24 horas, de manera que sedimenten las partículas gruesas. El líquido sobrenadante es descartado a continuación, puesto que los bacilos se encuentran en el sedimento. Las muestras

deben ser enviadas al laboratorio lo antes posible, después de haber sido juntadas.

HECES

Se juntan en vasijas estériles y una pequeña porción se transfiere a frascos de vidrio, también estériles, de boca ancha, con espátulas estériles. Para ser transportadas son preservadas por la adición de solución salina glicerínada a cada recipiente. Esta será constituida por glicerina 30% y 42% de cloruro de sodio en agua destilada.

MUESTRAS DE ESPUTOS

EXAMEN DIRECTO

1°.) Cuando las muestras son recibidas en el laboratorio, colocarlas en la refrigeradora hasta tanto se trabajen. Deben ser colocadas en una bandeja para que el refrigerador no se contamine.

2°.) Sacar las muestras del refrigerador y limpiar los frascos con un trapo empapado de alcohol. Lavarse las manos. Numerar las muestras, el frasco muestra, una caja de Petri estéril, un tubo de centrifuga (15 cc.), una tapa estéril, y un porta=objetos, limpio.

3°.) Disponer los porta=objetos en orden numérico sobre un soporte de donde pueden ser fácilmente tomados y se practica el extendido.

4°.) Colocar las muestras, las cajas de Petri y los tubos de centrifuga en orden numérico y en línea.

5°.) Colocar las muestras en las cajas de Petri y descartar el frasco para esterizarlo.

6°.) Utilizando una pipeta estéril con una pera de goma en un extremo seleccionar las porciones necróticas, caseosas, sanguinolentas del esputo y depositarlas en el tubo estéril de centrifuga en cantidad de dos a cinco centímetros cúbicos.

Cuando la muestra es líquida, dejar que sedimente, empleando entonces el sedimento. Cuando la muestra es muy espesa para la pipeta se emplean palillos de madera para separar las partes gruesas. Las partes elegidas se colocan en el tubo de centrifuga.

7°.) Del mismo modo elegir una parte purulenta o caseosa y colocarla en el porta=objetos y hacer el extendido con la misma pipeta o con otro porta=objetos.

8°.) Los bacilos extendidos deben ser fijados, teñidos y observados por otro técnico en tanto otro homogeniza las muestras. Si alguna muestra no puede trabajarse enseguida se coloca en la refrigeradora después que se ha colocado en los tubos de centrifuga y practicado los extendidos.

9°.) Cuando una muestra llega al laboratorio y se ha derramado y el frasco está contaminado, la muestra debe ser esterilizada y se hace un extendido del sedimento coagulado sin practicar cultivo.

10°.) Los porta=objetos son teñidos por el método Ziehl Neelsen:

a) Dejar secar los porta=objetos al aire o sobre una platina caliente;

b) Fijar los porta=objetos con llama o sobre platina eléctrica;

c) Colocar una tira de papel de filtro del tamaño del extendido sobre el porta=objetos. Esto previene un sedimento que se puede formar sobre el porta=objetos y evita que el colorante se derrame fuera de él;

d) Colocar la fucsina, calentar durante un minuto. Dejar enfriar durante cuatro minutos después del calentamiento;

e) Quitar el papel filtro y lavar con agua;

f) Decolorar con alcohol ácido durante dos minutos o hasta que el agua del lavado no tenga más colorante;

g) Lavar con agua;

h) Contraste con azul de metileno y lavado inmediato;

i) Secar al aire o por calor ligero;

j) Examinar los extendidos, cuatro líneas a lo largo o nueve líneas a lo ancho. Después de cada extendido positivo limpiar el lente antes de ver otro.

Los resultados se dan del modo siguiente:

NUMERO DE BACILOS VISTOS	PROTOCOLO	CODIGO
0	no encontrados	0
1 a 3	dar el número encontrado en el porta=objetos	X
4 a 20	pocos	1
21 a 100	número moderado	2
100 o más	muchos	3

11°.) Las muestras se disponen en grupos de ocho a diez, dependiendo de éste de la capacidad de la centrifuga. Cuando hay dos centrifugas, se preparan dos grupos de 8 a 10 tubos al mismo tiempo.

12°.) Destapar los tubos, flamear la boca y agregar a cada muestra un volumen igual de soda al 4%, que contiene 0.004% de rojo fenol como indicador (éste puede ser omitido).

13°.) Flamear todos los tubos, taparlos, cuidando que cada tapa corresponda. Se puede colocar una capa de vaselina alrededor del cuello para que lo cierre bien y no se derrame.

14°) Apretar las tapas y ver que no se pierdan y cuando así sucede transferir a otro tubo.

15°) Colocar los tubos en un agitador de pintura durante 10 minutos o agitar a mano o en un agitador de Kahn durante 15 minutos.

16°) Centrifugar 15 minutos a 3000 R. P. M. o diez minutos a 5000 R. P. M.

17°) Sacar las tapas, una por una, y descartar el líquido sobrenadante, en olla que se esteriliza. Flamear los tubos y tapar.

18°) Tratar los tubos individualmente agregando gota a gota 2NHCL (estéril) hasta que aparezca un color amarillo y luego se titula con solución 4% soda hasta que se obtenga un ligero tinte rosado persistente. Este es el mejor procedimiento pero habitualmente dos gotas de CLH 2N neutraliza la muestra sin titulación.

Mezclar bien cada sedimento con HCL y se hace un extendido, si se quiere del contenido, siendo éste el método llamado por homogeneización, colorando desde luego el extendido por el método Ziehl-Neelsen.

CONTENIDO GASTRICO

1°) Colocar la muestra en la refrigeradora durante cuatro horas o hasta que el sedimento se deposite en el fondo del frasco. Cuando las muestras son recibidas tarde para ser preparadas en el día, dejarlas estar en la refrigeradora durante la noche y tratarlas temprano al día siguiente.

2°) Tener cuidado de no mezclar el sedimento con el líquido sobrenadante. Limpiar los frascos con alcohol. Se numera la muestra, el frasco muestra y el tubo de centrifuga (tubos de 50 cc. de capacidad o dos de 15 cc. para cada muestra).

3°) Colocar todo en orden numerico.

4°) Descartar el líquido sobrenadante de cada muestra. Tratar de no derramar el líquido.

5°) Mezclar bien el sedimento, transferirlo a los tubos de centrifuga y centrifugar 15 minutos a 3000 R. P. M. o 10 minutos a 5000 R. P. M.

6°) Decantar el líquido sobrenadante de cada muestra. Flamear la boca de cada tubo y colocar las tapas.

7°) No se hacen frotis por las siguientes razones:

a) Habitualmente existen pocos bacilos como para encontrarlos;

b) A menudo se encuentran bacilos no patógenos, ácido-resistentes, que no pueden ser diferenciados microscópicamente del bacilo tuberculoso.

8°) Agregar un volumen igual de solución de NAOH al 4% que contenga 0.004% de rojo fenol.

9°) Colocar los tubos en el agitador de pintura durante 10 minutos o agitar a mano durante 15 minutos.

10°) Centrifugar durante 15 minutos a 3000 R. P. M. o 10 minutos a 5000 R. P. M.

11°) Decantar el sobrenadante. Flamear y colocar las tapas.

12°) Neutralizar el sedimento con 2N CLH y mezclar bien.

13°) Sembrar cuatro tubos (dos Low y dos Petraghine), con la mitad del sedimento.

Cuando no se hace inoculación, utilizar todo el sedimento. Dejar acostados los tubos por la noche, a 37° C., o durante una hora en el laboratorio cuando no hay espacio. Juntar los tubos y verticales, incubarlos a 37° C. Examinar cada semana y previo examen microscópico. Después de seis semanas informar todos los cultivos que no tengan crecimiento.

14°) Transferir lo que queda de sedimento a un tubo que contenga 1 cc. de suero fisiológico para la inoculación para el cobayo que es inoculado por vía subcutánea.

LIQUIDOS ORGANICOS

1°) Se hacen extendidos de los líquidos a partir del sedimento neutralizado, utilizando la siguiente técnica modificada.

a) Colocar una gota de albúmina de Mayer en un porta-objetos; con una pipeta capilar, colocar varias gotas del sedimento neutralizado. Se extiende con la pipeta y se deja secar al aire. Se fija y se tiñe.

b) Colocar carbol-fucsina. Se calienta un minuto y se deja 4 minutos más sin calentamiento;

c) No lavar;

d) Colocar los extendidos en el congelador (Freezing);

e) No lavar. Se coloca directamente con alcohol ácido durante dos minutos o hasta que no salga más colorante;

f) Lavar y coloración de contrastes. Informar como para los esputos.

2°) Líquidos especiales (céfalo-raquídeo).

Se utiliza el mismo procedimiento que para los esputos, salvo:

a) Sembrar dos tubos de medio con una pequeña porción de líquido no tratado (sedimento);

b) Tratar la otra mitad con NAOH al 4%. Neutralizar con 2N HCL y centrifugar;

c) Sembrar dos tubos de medio con el sedimento;

d) A causa de que habitualmente se encuentran pocos bacilos en el líquido espinal, es mejor emplear todo el sedimento para el cultivo más bien que gastarlo en extendidos que probablemente serán negativos.

3°) Orina.

Dejarla estar en la refrigeradora cuatro horas o hasta que el sedimento se deposite. Decantar y emplear el sedimento. Seguir el mismo

procedimiento neutralizado, utilizando lo que se emplea para los gástricos, excepto que se practica un frotis del sedimento neutralizado utilizando la técnica modificada de Ziehl-Neelsen con albúmina de Mayer.

A causa de que la orina se deteriora rápidamente es necesario proceder lo más pronto posible y debe ser refrigerada hasta ser examinada.

El *Mycobacterium Smegmatis*, no patógeno, es un habitante frecuente del trato genital y puede estar presente en la orina.

VARIANTES DE LAS TECNICAS PARA FROTIS Y CULTIVO

Frotis: Método del fenol esterilizado. Cuando se hace frotis pero no cultivos ni inoculaciones, puede utilizarse este método: 5 cc. de fenol al 5% a la muestra y mezclar bien. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Transferir a un tubo de centrifuga durante 15 minutos a 3000 R. P. M. o 10 minutos a 5000 R. P. M. Decantar y hacer extendidos del sedimento.

Método del autoclave:—Cuando las muestras llegan al laboratorio y se observa evidentemente que han sido derramadas en el viaje y por lo tanto el frasco está contaminado, sacarla con cuidado con un papel o un trapo, que luego se puede esterilizar. Después que la muestra ha sido esterilizada, tomar las partes blancas coaguladas y practicar extendidos.

Cultivos: Se ha visto que una solución al 10% de fosfato tribásico de sodio (23% de la sal hidratada) es tan efectivo como la soda al 4% para destruir los organismos contaminados y es menos tóxica para el bacilo ácido-resistente. De acuerdo al trabajo de Corper y Stoner, los organismos quedan vivos durante una semana a temperatura ambiente en presencia de esa solución. Cuando se requieren 24 horas o más para que las muestras lleguen al laboratorio, el fosfato trisódico puede ser agregado a los frascos muestras antes de coleccionar el material y ser así utilizado como tratamiento preliminar en lugar de la soda.

1°) Preparar los frascos esterilizados y agregar 10 cc. de una solución al 10% de fosfato trisódico, una cantidad equivalente al volumen de la muestra que será unida a cada frasco. Se esterilizan 15 libras durante 15 minutos.

2°) Cuando la muestra llega al laboratorio se transfiere a tubos de centrifuga.

3°) Agitar 10 minutos en el agitador de pintura o 15 minutos en un agitador serológico.

4°) Centrifugar 15 minutos a 3000 R. P. M.

5°) Destapar, decantar, flamear y volver a tapan.

6°) Neutralizar el sedimento con una o dos gotas de HCL 2N y se siembran cuatro tubos con el sedimento. Se hacen frotis del sedimento.

7°) Cuando se van a inocular cobayos transferir la mitad del sedimento en un tubo con 1 cc. de solución fisiológica e inocular de acuerdo a la técnica.

METODO DE ZIEHL NEELSEN MODIFICADO

- 1°.) Colocar los extendidos en 0.50 de bicarbonato de sodio durante tres a cinco minutos.
- 2°.) Teñir durante 5 o 10 minutos con carbol fucsina.
- 3°.) Lavar con agua corriente.
- 4°.) Decolorar con alcohol ácido durante dos minutos o hasta que el colorante se remueva.
- 5°.) Lavar con agua corriente.
- 6°.) Contrastar con azul de metileno que ha sido diluído de 1 a 10 durante un minuto.
- 7°.) Lavar con agua corriente.
- 8°.) Colocar en alcohol a 95% durante dos minutos.
- 9°.) Aclarar con xilol un minuto.
- 10°.) Montar en bálsamo o clarita.

REACTIVOS

Solución de verde malaquita

Verde malaquita	2 gms.
Agua destilada.....	98 gms.

Disolver el verde malaquita en el agua, repartir en tubos o frascos y esterilizar a 15 libras 15 minutos.

Solución de soda al 4%

Soda	40 gms.
Agua destilada.....	950 gms.
Fenol rojo (0.4%)	10 gms.

Disolver la soda en el agua, agregar el rojo fenol, repartir en frascos y esterilizar a 15 libras 15 minutos.

Solución de HCL aproximadamente 2/n

HCL (37%)	197 cc.
Agua destilada.....	803 cc.

Agregar ácido al agua, lentamente, y cuando todo ha sido mezclado repartir en tubos, esterilizar a 15 libras 15 minutos.

Solución de fosfato de sodio dibásico

Fosfato de sodio dibásico	200 gms.
Agua destilada.....	500 gms.

Disolver el difosfato en agua por calentamiento. Agregar 15 cc. de solución caliente a cada frasco. Esterilizar con la tapa floja y refrigerar para que cristalice. Basta para neutralizar 45 cc. de HCL N/10.

Albúmina de Mayer

Agitar un blanco de huevo que deberá esperar y quedar seco. Dejarlo estar hasta que aclare y filtrar por papel. Agregar una cantidad igual de glicerina y mezclar. Se puede agregar un cristal de thymol como conservador. Guardar en la refrigeradora.

También puede ser:

Un blanco de huevo	50 cc.
Glicerina	50 cc.
Salicilato de Sodio	1 gm.

Agitar bien y filtrar por papel. Utilizar una gota sobre la superficie del porta-objetos.

Colorantes

Ziehl Neelsen.

Fucsina básica saturada

Fucsina básica.....	17.5 gms.
Alcohol etílico (95%)..	500 cc.

Disolver la fucsina en una pequeña cantidad de alcohol triturando en un mortero aquélla. Colocar en un bote; enjuagar lo que queda en el mortero con el alcohol restante.

Carbol fucsina (para colorear)

Solución de fucsina saturada.....	100 cc.
Fenol (solución acuosa 5%).....	900 cc.

Mezclar y dejar en reposo durante 24 horas. Filtrar.

Solución saturada de azul de metileno

Azul de metileno	10 gms.
Alcohol etílico	100 cc.

Disolver el azul en el alcohol en un mortero y colocar en frascos.

Colorante de azul de metileno

Solución saturada de azul de metileno	30 cc.
Agua destilada.....	100 cc.

Alcohol ácido

Acido clorhídrico.....	3 cc.
Alcohol etílico (95%).....	97 cc.

o si no:

Ácido sulfúrico	4 cc.
Alcohol etílico (95%).....	95 cc.

o:

Ácido nítrico.....	5 cc.
Alcohol etílico (95%).....	95 cc.

Carbol fucsina de Kinyoun

Es una modificación de la fórmula de Ziehl Neelsen. Tiene un alto porcentaje de fucsina. Es satisfactorio cuando se tiñen varios extendidos, sin embargo debe ser filtrada antes de usarse cuando sirve para varios, puesto que los bacilos pueden escapar del frotis y estar presentes en el colorante. No se conocen referencias del original.

Fucsina básica	4 gms.
Cristal fenol.....	8 gms.
Alcohol etílico (95%).....	20 cc.
Agua destilada.....	100 cc.

Disolver la fucsina básica en el alcohol en un mortero. Hacer la solución de fenol y se agrega la solución alcohólica de fucsina. Filtrar.

Método de Gabbett

Azul de metileno.....	2 gms.
Ácido sulfúrico concentrado	25 cc.
Agua destilada.....	75 cc.

Técnica.—Fijar por calor los extendidos. Cubrir con carbol fucsina de Kinyoun y dejarlo estar sin calentar durante 30 minutos. Lavar con agua destilada. Colocar en los extendidos solución de Gabbett (bien cubiertos). Dejarla de 3 a 10 minutos. Esta coloración decolora y colora el fondo al mismo tiempo. Lavar y secar.

Cultivos.—El estudio de la biología de los microbios nos enseña que éstos deben de disponer de determinados materiales para que puedan efectuar su intercambio metabólico. En este concepto se basa la preparación de los medios de cultivo que se utilizan para conservar y favorecer el desarrollo de los microbios in-vitro. La composición de estos medios varía según la especie bacteriana a que están destinados ya que algunas de ellas muestran exigencias que es necesario satisfacer para obtener su desarrollo. Los factores más importantes para obtener un buen resultado son la consecuencia de usar buenos medios de cultivo y dar el tratamiento propio al material (muestra de esputo, etc.), que se va a examinar.

Expondremos en este ligero estudio los medios de cultivo especiales para cultivar el mycobacterium tuberculoso puesto que no cultiva en medios comunes.

Los más usados son los siguientes:

Medio de Lowenstein (Jensen-Holm modificado)

Composición

Fosfato monopotásico	2.4	gms.
Sulfato de magnesio	0.24	gms.
Citrato de magnesia	0.6	gms.
Asparragina	3.6	gms.
Glicerina (2 veces dest.....)	12.0	cc.
Agua destilada	600.0	cc.
Fécula de patata.....	30.0	cc.
Huevos frescos (1 lt., 20 huevos)...	1000.0	cc.
Verde de malaquita 2% (estéril)...	20.0	cc.

Preparación:—Preparar la solución de sales y calentar hasta disolución en baño de maría, durante dos horas. Refrigerar hasta el día siguiente. Agregar fécula de patata y hervir en baño de maría agitando hasta que el contenido sea traslúcido y continuar el calentamiento por hervor 15 minutos. Dejar estar a 56° durante una hora. Preparar los huevos, los cuales son lavados en solución de jabón por 30 minutos, entonces son puestos en agua corriente hasta que el agua esté clara. Cubrirlos con alcohol a 70%. Poner dos o siete a la vez en una toalla limpia para secarlos; romper los huevos en frasco estéril o en un galón de cristal, dejando que la clara pase primero y después romper la yema y dejarla pasar.

Agítese bien y agregar el verde malaquita y la solución de sal. Envasar a 85-88 grados centígrados durante cuarenta minutos en dos o tres días consecutivos.

Medio de Petraghini (Frabisher)

Mezcla A

Leche descremada.....	225.0	cc.
Almidón de patata	9.0	gms.
Peptona	1.5	gms.
Patatas sin corteza y cortadas.....	150.0	gms.

Mezcla B

Huevos frescos	8	
Glicerina	18.0	cc.
Verde malaquita (2%).....	15.0	cc.

Mezcla C

Dextrosa	1.5	gms.
Asparragina	1.5	gms.
Agua destilada estéril.....	50.0	cc.

Preparación:—Lavar las patatas con agua, pelarlas y cortarlas en pequeños trozos. Pesarlas y combinar patatas, leche, almidón de patatas, peptona y calentar la mezcla en baño de maría hasta que se forme una pasta, al cabo de dos horas. En tanto la mezcla se calienta, preparar la solución C y disolver. Lavar los huevos frescos (técnica conocida); enfriar la mezcla A a 50 grados y agregar los huevos, verde malaquita y glicerina, luego la mezcla C. Agitar bien y filtrar por gasa. Envasar. Coagular a 85-88 grados, durante 40 minutos durante dos días sucesivos.

Cuando se utilizan tapones de algodón, ajustarlos y cerrar con parafina. Controlar y guardar en la refrigeradora.

Medio de Petraghini (modificado)

Patatas peladas y cortadas.....	450 gms.
Leche (descremada).....	900 cc.
Almidón de patatas.....	36 gms.
Peptona.....	5 gms.
Glicerina	70 cc.
Huevos frescos.....	24
Verde malaquita (2 ^o / _o).....	60 cc.

Preparación:—Preparar los huevos (técnica conocida). Agregar glicerina, agua destilada y mezclar. Envasar y coagular a 85 grados centígrados durante 40 minutos en dos días sucesivos. Si se tapa con algodón, parafinar. Controlar y guardar en la refrigeradora.

Medio de Petroff

1) Glicerina extracto de carne.....	
Carne de vaca o ternera (bien cortada)	500 gms.
Glicerina	75 cc.
Agua destilada.....	380 cc.

Mezclar bien y dejar en lugar fresco durante veinticuatro horas. Filtrar a través de gasa. Recoger en frasco estéril.

2) Glicerina extracto de carne.....	330 cc.
Huevos	660 cc.
Violeta de genciana (1 ^o / _o) Sol. alcohólica	10 cc.

Preparación:—Preparar los huevos y agregarlos al extracto. Agregar el violeta de genciana y mezclar. Filtrar por gasa y colocar en tubos. Coagular a 85 grados centígrados durante 40 minutos en dos o tres días sucesivos. Controlar y colocar en la refrigeradora.

Medio al Huevo de Dorset (modificado)

Huevos	24
Glicerina	20 cc.
Agua destilada.....	380 cc.

Preparación:—Preparar los huevos. Agregar glicerina y agua destilada y mezclar. Envasar en tubos y coagular a 85 grados centígrados durante 40 minutos en dos días sucesivos. Si se tapa con algodón, para-rafinar. Controlar y guardar en la refrigeradora.

Medio de Sautón (medio líquido)

Asparragina	4	gms.
Fosfato monopotásico.....	0.5	gms.
Glicerina	60	cc.
Sulfato de magnesia	0.5	gms.
Citrato de hierro amoniacal.....	0.05	gms.
Agua destilada	940.0	cc.
Acido cítrico	2.0	gms.

Preparación—Disolver las sales por calentamiento en un frasco con el agua destilada. Hervir durante un minuto y dejar enfriar. Agregar glicerina. Mezclar bien y ajustar el PH a 7.4. Dividir la cantidad deseada en frascos y esterilizar a 15 libras 15 minutos.

Medio Le Proskauer y Beck (modificado)

Asparragina	5.0	gms.
Fosfato monopotásico	5.0	gms.
Glicerina	20.0	cc.
Sulfato de potasio.....	0.5	gms.
Citrato de magnesia.....	1.5	gms.
Agua destilada	1000.0	cc.

Preparación:—Agregar los ingredientes uno por uno, antes de agregar el otro hacerlo cuando esté disuelto el anterior. Antes de agregar el citrato de magnesia ajustar el PH a 7 con NAOH al 40%. Agregar el citrato de magnesia y colocar en frascos. Esterilizar a 15 libras durante 15 minutos. Cuando se forma precipitado, filtrar y volver a esterilizar.

Medio de Kirchner

Fosfato dibásico de sodio.....	3	gms.
Fosfato de potasio monobásico...	4	gms.
Sulfato de magnesia	0.6	gms.
Citrato de Sodio.....	2.5	gms.
Asparragina	5.0	gms.
Citrato de hierro amoniacal.....	0.05	gms.
Glicerina	20.0	cc.
Tween 80 (agregar 5 cc. de sol. 10%)	0.05	gms.

Mezclar los ingredientes y esterilizar a 15 libras 15 minutos. Agregar asépticamente suero albúmina humana 10%, 10 cc. Repartir asépticamente en tubos o frascos.

Medio Albúmina (ácido oleico)

Fosfato potásico monobásico...	1.0	gms.
Fosfato de sodio dibásico.....	6.3	gms.
Asparragina.....	2.0	gms.

Calentar a 100 cc. de agua destilada hasta dis.

Agregar:

Agua destilada	850.0	gms.
Digestión enzimática de caseína	0.5	gms. (10 cc. sol. 5%)
Citrato de fe amoniacal.....	0.05	gms. (1 cc. sol. madre 5%)
Sulfato de magnesía	0.01	gms. (1 cc. sol. 1%)
Cloruro de calcio.....	0.0005	gms. (1 cc. sol. 0.05% Stock)
Sulfato de zinc	0.01	gms. (1 cc. sol. 1%)
Cloruro de cobre.....	0.0005	gms. (1 cc. sol. 0.05%)
Sulfato de zinc	0.0001	gms. (1 cc. sol. 0.1% Stock)
Sulfato de cobre.....	0.0001	gms. (1 cc. sol. 0.01%)

Ajustar a P. H. 6.8.

Agregar 100 cc. de la siguiente preparación de complejo ácido=oleico=albúmina:

- 1) Disolver 0.12 cc. de ácido oleico (0.1 gms.) en 10 cc. de n/20 NAOH agitando en un movimiento de rotación en un frasco pequeño.
- 2) Agregar 5 cc. de esta solución a 95 cc. de agua destilada, lo que da solución al 5%.
- 3) Esterilizar por filtración (porcelana).

Cuando se desea un medio sólido agregar 15 cc. de bac-agar antes de esterilizar. Se puede agregar penicilina para inhibir el crecimiento de otros organismos (100 unidades por cada centímetro cúbico de medio).

Medio Líquido de Tween 80 de Dubos y Middlebrook

Fosfato de potasio monobásico.....	1.0	gms.
Fosfato de sodio dibásico.....	6.3	gms.
Asparragina	1.0	gms.
Digestión enzimática de caseína	0.50	gms.
Citrato de Fe. amoniacal (0.1 cc. 5%)...	0.005	gms.
Sulfato de magnesía	0.01	gms.
Cloruro de Calcio	0.0005	gms.
Sulfato de Zinc	0.0001	gms.
Sulfato de cobre.....	0.0001	gms.
Tween 80 10%	5.0	gms.
Agua destilada	1000.0	cc.

Ajustar PH 6.8.

Preparación:—Preparar el medio de acuerdo con las instrucciones dadas para el medio=ácido=oleico=albúmina. Esterilizar a 15 libras 15 minutos y agregar a cada 100 cc. de medio estéril:

Dextrosa (sol. 25% esterilizada a 10 libras,
15 minutos)..... 2.0 cc.

Albúmina (plasma al 5%, fracción bovina V
en 0.85% de cloruro de sodio y es-
terilizar por filtro (Zeits). Antes
de filtrar ajustar PH a 7..... 10.0 cc.

Se puede agregar penicilina para impedir el desarrollo de otros gérmenes.

Para mezclar los medios resulta satisfactorio usar frascos de boca ancha. Un frasco de boca con una tapa de material plástico, estéril, se recomienda para mezclar sales y disolverlas previamente. Cuando los tubos para los medios de cultivo son tapados con algodón, deben ser cerrados con parafina. Se puede emplear el parafilm en vez de parafina calentada. Cuando no se dispone de aparato distribuidor de medios, se puede preparar en el laboratorio. Se requiere un frasco Erlenmeyer, cerrado con un tapón de goma sólido. Se perfora el tapón en dos partes, pasando por cada orificio un tubo de vidrio de 5 a 7 mm. Estos son cortados en dos medidas, uno de los cuales se extiende de 2.5 pulgadas a 3 pulgadas por fuera del tapón y más o menos una pulgada por dentro. El otro tubo se extiende hasta el fondo del frasco y más o menos tres pulgadas por fuera, la porción externa curvada en un ángulo de 35 a 40 grados y tapada con algodón. El tubo recto es también tapado con algodón y todo el aparato envuelto se esteriliza. Se prepara el tubo de goma de cinco pulgadas de largo con un clamp de metal y comunicado a una campana envasadora. Cuando se va a utilizar el frasco es invertido y colocado en un anillo de metal (soporte). Antes se ha sacado el algodón del tubo recto y se ha asegurado la campana envasadora con el tubo de goma cerrado en el clamp. Estos aparatos pueden ser preparados y esterilizados para hacer medios para la prueba de sensibilidad (en frascos pequeños) como en otros frascos grandes para otros medios.

CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS EN LOWENSTEIN-JENSEN-HOLM

a) *Tipo humano*.—Aparecen habitualmente entre doce y veinticinco días y se llaman eugónicas a causa de su crecimiento profuso. Las colonias son rugosas, secas, friables, amontonadas o levantadas, a veces con la apariencia de un repollo. Tienen un color crema o amarillo pálido. Son fácilmente desprendidas del medio, pero son difíciles de emulsionar y suspender en solución, permaneciendo los bacilos en grumos. Las colonias miden habitualmente de 4 a 8 mm. de diámetro.

b) *Tipo bovino*.—No desarrollan tan rápidamente, ni tan frondosas como las del tipo humano. Habitualmente aparecen de 25 a 40 días; son pequeñas, piramidales, más pequeñas que las de tipo humano. Se

adhieren al medio y se emulsionan más fácilmente que éstas. A causa de que el crecimiento es lento y escaso, son llamadas disgónicos. Las colonias son de 1 a 2 mm. de diámetro.

c) *Tipo aviario*.—Son colonias un poco más grandes que las bovinas y aparecen de 14 a 21 días. Son lisas, redondeadas y a menudo tienen un pigmento ligeramente amarillo o rosado. Son mucóideas y resistentes y se suspenden fácilmente en solución fisiológica. Tienden a dar un crecimiento cremoso y homogéneo, más que las del tipo humano y bovino. Crecen de 40 a 45 grados, en tanto que las otras no.

d) *Ácidos resistentes saprófitos*.—Son habitualmente cromógenas y aparecen en pocos días. Son colonias blandas, cremosas, lisas, que se suspenden fácilmente en solución; muchas desarrollan a temperatura ambiente. Algunas saprófitas no son pigmentadas y son difíciles de distinguir sus colonias de las formas virulentas. Deben entonces ser inoculadas al cobayo para titular su virulencia.

EXAMEN DE LOS CULTIVOS

a) Después que los cultivos han sido sembrados e incubados, deben ser examinados cada semana hasta llegar a seis.

b) Cada semana todos los cultivos son examinados con buena luz, utilizando un lente de mano u otro vidrio de aumento. Todo cultivo contaminado se descarta y se informa "contaminado".

Todos aquellos que tienen colonias que se parecen a las del *Mycobacterium Tuberculoso*, se examinan microscópicamente.

Los que no muestren desarrollo son colocados en la incubadora. Luego son examinados a la semana siguiente. Los cultivos que no muestran desarrollo después de seis semanas, de incubación se informan "no hay desarrollo después de seis semanas".

c) Todos los cultivos positivos, deben ser examinados microscópicamente. Se numera un porta-objetos y se coloca una gota de agua destilada. Se toma una colonia típica del cultivo con asa y se le suspende en la gota de agua. La colonia es emulsionada con el asa y se deja secar. Fijar con calor y colorear con Ziehl-Neelsen. Buscar ácido-resistentes.

d) Cuando las colonias tienen el aspecto característico de las pertenecientes al bacilo tuberculoso y el frotis tiene bacilos ácido-resistentes, informar el número de colonias que "morfológicamente se parecen a las del *Mycobacterium Tuberculosis*".

e) Informar los cultivos cromógenos de ácido-resistentes como colonias "morfológicamente parecidas a las de los ácido-resistentes saprófitas".

f) Cuando aparecen colonias no pigmentadas de ácido-resistentes que no se parecen a las del *Mycobacterium Tuberculosis*, se transfiere una colonia. Suspender varias colonias en solución fisiológica para titular

la virulencia. Es importante que el test de virulencia en el cobayo se realice con todos los cultivos atípicos que no pueden ser identificados por cultivos. Informar de este modo: "se aíslan colonias de ácido-resistentes. Se realizarán ulteriores estudios".

g) Cuando las colonias tienen el aspecto de bovino o aviar, la tipificación en el animal debe practicarse para que el técnico pueda confidencialmente identificar los diferentes tipos por las características culturales.

b) Los cultivos descartados deben ser esterilizados a 20 libras durante veinte minutos.

SUB-CULTIVOS

A) Cuando en el primer aislamiento las colonias son atípicas, muy numerosas o pocas para la identificación, se deben trasplantar al Lowenstein. Requiere, por lo menos, cinco colonias bien aisladas para la identificación cultural.

B) Numerar un tubo de centrifuga y un porta=objetos para cada cultivo que debe ser sub=cultivado.

C) Agregar dos o tres gotas de agua destilada estéril a cada tubo de centrifuga.

D) Picar una colonia de cultivo con el asa, emulsionarla, rompiendo la colonia contra el vidrio (paredes) hasta que se suspenda en el agua.

E) Agregar un centímetro cúbico de agua y mezclar bien hasta hacer una suspensión uniforme y se siembra un tubo con gota de la suspensión. Utilizando la misma pipeta se la carga con varias gotas de agua destilada estéril y se enjuaga bien varias veces y con una gota de esto se siembra un segundo tubo. Se hace el extendido de la primera suspensión, se colora y se observa.

F) Inocular a treinta y siete grados centígrados y se examina cada semana hasta llegar a seis.

G) Cuando los cultivos están contaminados, emulsionar la colonia en dos o tres gotas de agua, agregar 2 cc. de NAOH al 4% en tubos de centrifugas.

H) Flamear los tubos, tapar y agitar durante 10 minutos con las manos o en el agitador.

I) Diluir la suspensión con 5 cc. de agua destilada estéril y centrifugar 15 minutos a 3000 R.P.M.

J) Decantar y sembrar un tubo con una gota de sedimento, diluir el sedimento con 1 cc. de agua destilada y sembrar un segundo tubo del sedimento diluido. Enjuagar la misma pipeta con dos o tres

gotas de agua destilada o si no utilizar el agua de condensación del tubo y sembrar un tercer tubo con una gota de éste. El frotis debe hacerse del sedimento. Incubar a 37 grados y examinar una vez por semana. Cuando las colonias en los sub-cultivos no son típicas, inocular un cobayo para titular la virulencia.

INOCULACION EN ANIMAL SENSIBLE

Selección y cuidado de los animales: Se deben utilizar cobayos que pesen más de doscientos cincuenta gramos, pero es mejor de 400 a 500 gramos. Cuando sea posible, los animales deben ser obtenidos en la misma fuente para asegurar la uniformidad del tamaño, salud y alimentación.

Después de obtenidos los animales deben ser observados durante dos semanas antes de ser utilizados para ver si están mal nutridos o enfermos.

Durante este período deben ser probados con tuberculina para asegurar la no existencia de una tuberculosis espontánea. Deben ser alimentados con una dieta uniforme que incluye protaínas, granos y vegetales verdes o pasto. Las jaulas deben ser limpiadas cada día. Se coloca un papel grueso en el fondo de la jaula, el cual pueda fácilmente ser cambiado cada día por un papel limpio. El papel que se saca debe ser incinerado o esterilizado. Las jaulas deben ser lavadas cada semana con fenol al 5% o cresol al 5% y colocadas a la luz del sol durante dos días. Cuando se dispone de un autoclave es mejor esterilizarlas.

Los cobayos deben ser probados con tuberculina, ya sea con 0.1cc. de tuberculina vieja de Koch al 5% o con 1.00cc. de P.P.D. que contenga 0.005mm. La tuberculina es inyectada por vía intradérmica en la superficie ventral del cuerpo del animal. Cuando el resultado es positivo aparece una induración de 5mm. en 48 horas y el animal se debe sacrificar para asegurar de este modo que los otros animales negativos no sean infectados.

Inoculación directa: Cuando la inoculación es hecha directamente de las muestras, se trata con NAOH al 4% como se ha señalado previamente.

Emplear la mitad del sedimento diluido con 1 cc. de solución fisiológica estéril e inyectar de 1 a 3cc. por vía-cutánea en la pata derecha.

El líquido céfalo-raquídeo y las orinas obtenidas por sondaje deben ser centrifugadas, inoculándose el sedimento sin tratamiento previo.

Inoculación de los cultivos: Cuando las inoculaciones son practicadas de cultivos, deben emplearse suspensiones standarizadas de cultivos (Bacilos). Uno de los métodos más cómodos es obtener el peso húme-

do utilizando en él tubos de centrifugas Hopkins Vaccine. El tubo está graduado en 1.5 a 10cc. y cada 0.01 de bacilos sedimentados, se asigna el peso húmedo de un miligramo.

a) Colocar varias gotas de solución fisiológica en un tubo de centrifuga estéril y transferir con el asa varias colonias típicas de cultivo al tubo. Separar los bacilos contra las paredes del mismo (con el asa) y suspenderlos con solución fisiológica.

b) Agregar 5cc. de solución fisiológica al tubo y mezclar bien con la solución de bacilos. Dejar que los grumos gruesos sedimenten en el fondo y transferir la suspensión a otro tubo estéril.

c) Transferir 1 cc. de la emulsión a un tubo Hopkins y centrifugar durante 30 minutos a 3000 R.P.M. o 15 minutos a 5000 R.P.M.

d) Medir el volumen de los bacilos sedimentados en el fondo del tubo por medio de las graduaciones y determinar el peso húmedo. Cada 0.01 es equivalente a 1 miligramo y por lo tanto cada centímetro cúbico de la suspensión tiene el número de miligramos medidos en el tubo de Hopkins. No utilizar los bacilos de éste.

e) Preparar las diluciones de la suspensión con solución fisiológica estéril en forma que la dilución final contenga 0.1 de miligramo de bacilos por cc.

f) Inocular 1cc. de la suspensión que contenga 0.1 miligramo de bacilo por vía subcutánea en la pierna derecha del cobayo.

g) Preparar los sub-cultivos utilizando un asa de la suspensión sobre Lowestein en forma de tener cultivos frescos, si es que la prueba de virulencia debe ser repetida, para centrifugar la vitalidad del cultivo y estudiar sus características después que los resultados del animal sean obtenidos. Colocar los tubos verticales en la estufa a 37°C. Después de haber estado acostados a la misma temperatura durante 24 horas. Examinar de tiempo en tiempo.

Patología.—A las tres semanas, después de la inoculación, aparece un absceso subcutáneo en el punto de la inoculación y existe una tuberculosis generalizada con agrandamiento de los ganglios linfáticos. Existen lesiones visibles en los pulmones, brazo, hígado y otros órganos. Los animales mueren en un lapso de cinco a seis semanas. Sin embargo, cuando el animal tiene una prueba tuberculínica positiva, después de cuatro semanas debe ser sacrificado y autopsiado. La enfermedad está caracterizada por una respuesta inflamatoria progresiva en la que las lesiones se hacen de carácter nodular y caseosas. Los ganglios inguinales superficiales, sub-lumbar, portal, mediastinal y brónquicos se agrandan y tienen áreas necróticas de color amarillento. Los pulmones tienen tubérculos con el aspecto de masas gelatinosas pequeñas. La inyección intraperitoneal es seguida por la muerte en dos o tres semanas y existe una lesión caseosa en la pared abdominal. Por otro lado, la patología es similar a la encontrada en los cobayos inoculados por la vía sub-cutánea.

Autopsia.—Se necesita una bandeja esterilizada con agarraderas y cada uno de los cobayos sobre ella con la superficie ventral hacia arriba y sus extremidades atadas a los cuatro ángulos. A continuación se les anestesia con éter y es muerto. La superficie ventral se limpia con alcohol al 70% y se hace una incisión media vertical; en seguida, se hace otra media horizontal en forma que la piel caiga y los órganos queden expuestos.

Extendidos y cultivos.—Estos pueden hacerse de órganos que muestren lesiones tuberculosas. Sin embargo, la muestra debe ser tomada inmediatamente después de la muerte, puesto que existe una invasión terminal post-mortem de la corriente sanguínea y órganos por otras bacterias, lo que dificulta obtener bacilos en cultivo puro. Se pueden emplear dos métodos para obtener material para extendidos y cultivos:

a) Se puede quemar la superficie del órgano para destruir los organismos contaminantes; hacer una punción a través de la superficie del órgano, utilizando una aguja estéril (16 ó 18) adaptada a una jeringa. El tejido es lacerado con la aguja y el material aspirado. Luego se siembra en tubo de Lowestein y se hacen extendidos. Este debe ser teñido por la técnica de Ziehl-Neelsen, modificado como la aconsejada para los líquidos orgánicos.

b) Sacar tejidos o porciones de órganos enfermos con bisturí o pinzas (esterilizadas) colocándolos en un mortero estéril; cortar los tejidos en pequeños trozos y se trituran con la mano del mortero, usando una pequeña cantidad de solución fisiológica, agregada poco a poco. Cuando el tejido ha sido suficientemente macerado y emulsionado, transferirlo a un tubo de centrifuga y tratarlo con igual cantidad de NAOH al 4%. Homogeneizar con el agitador durante 10 minutos, centrifugar y neutralizar. Se siembra el Lowestein y se preparan tendidos del sedimento, utilizando la albúmina de Mayer y la técnica de Ziehl modificada.

c) Para hacer extendidos y cultivos de abscesos abiertos se obtiene el material con asa estéril o aspirando con una pipeta capilar con pera de goma en la punta.

Cortes de tejido.—El procedimiento puede ser seguido para tejidos animales o humanos.

a) Sacar los tejidos o glándulas que se muestren agrandadas con necrosis, nódulos o abscesos, y colocarlos en frascos que se pueden identificar describiendo el aspecto microscópico.

b) Cortar secciones de tejidos, aproximadamente de 2 x 3 x 0.5 cms. y filtrarlos en seguida con formalina al 10% o solución de Zenker. Estas conservan la estructura celular. Dejarlos en la solución de 12 a 24 horas y lavarlos en agua corriente. El tejido puede quedar en formalina indefinidamente, pero debe ser retirado del líquido de Zenker a las 24 horas. Cuando los tejidos no pueden ser preparados en seguida, deben ser conservados en alcohol al 80%.

Las soluciones para los tratamientos ulteriores de los tejidos, deben ser colocadas en frascos de boca ancha.

Preparar las soluciones y tratar las muestras en la siguiente forma:

- 1) Alcohol al 80%..... 2 a 4 horas.
- 2) Alcohol al 95%..... 2 a 4 horas.
- 3) Cloroformo..... 2 a 4 horas.
- 4) Cloroformo saturado con parafina, dejarlo una noche a 37°
- 5) Parafina (54-58 grados) dejarlo una noche a 37°
Llenar las cavidades de 2 a 4 horas. Infiltrar los tejidos, y
- 6) Depositar las preparaciones calentadas en medios de metal o de papel con la superficie desecada para abajo.

Asegurar la alimentación de burbujas de aire. Sumergir en agua fría cuando la parafina aún está caliente y colocar en la refrigeradora para que enfríe rápidamente.

7) Adaptar los bordes de la parafina en forma que los opuestos sean paralelos, dejando un reborde estrecho de parafina.

8) Calentar un molde de metal y se monta el corte en él. Sumergir en agua fría.

9) Asegurar una buena navaja y bien plantada en el micrótomo. Los bordes de la navaja deben estar inclinados sobre el block en tal forma que no toque la superficie interior de la navaja. Los bordes inferiores del block deben ser paralelos a la navaja. Cortar secciones lo más delgadas posible, de 10 micrones de grueso.

10) Colocar los cortes sobre la superficie de agua caliente (40 a 50 grados) y separar las cintas con cortaplumas caliente.

11) Extender una gota de albúmina de Mayer sobre el porta=objetos y colocar el corte por encima.

12) Escurrir el agua del porta=objetos y colocarlo en la estufa durante media hora, para fijar la albúmina o colocarlo en una platina caliente o en un bunsen hasta que la parafina se derrita.

13) Sacar la parafina sumergiendo el porta=objetos en xilol durante varios minutos. Cuando el tejido ha sido fijado por Zenker agregar una gota de yodo al alcohol para precipitar el mercurio. Enjuagar en alcohol al 95% y luego en agua destilada. Se tiñe.

TIPIFICACION DE CULTIVOS POR INOCULACION ANIMAL

Cuando se planta la cuestión de saber si el cultivo es humano, bovino o saprófito se deben inocular animales apropiados. Las suspensiones deben ser estandarizadas empleando el neofelómetro de McFarland o por medida del peso húmedo con el tubo de Hopkins.

1) Determinar el peso húmedo con el tubo de Hopkins; transferir varias colonias típicas a un tubo estéril que contenga varias gotas de solución fisiológica. Emulsionar los bacilos con el asa contra las paredes del tubo, disgregándolos primero (se puede confeccionar una espátula aplanada en un extremo, un hilo de platino e iridio. Platino 70%, Iridio 30%).

Después que las colonias están bien emulsionadas agregar 5 cc. de solución fisiológica o agua destilada tratando de hacer una suspensión uniforme de los organismos. Dejar que los grumos gruesos sedimenten en el fondo del tubo y se transfiere el sobrenadante a un tubo estéril.

2) Transferir 1 cc. de la suspensión al tubo de Hopkins y centrifugar a 3000 R. P. M. durante 30 minutos. El cuerpo del tubo está graduado en 1.5 y 10 cc. y el tallo en 0.05 y 0.01 cc. de organismos depositados está asignado al peso húmedo de un miligramo.

3) Después que se ha terminado de establecer el peso húmedo de los bacilos por cc. de suspensión, hacer la dilución apropiada con solución fisiológica o agua destilada para la inoculación animal. Cuando no se tenga suficiente crecimiento para obtener la cantidad de bacilos, el cultivo puede ser transferido a un medio líquido sintético como el Tween 80 o medios similares que darán el mayor crecimiento en pocos días. El peso húmedo debe ser tomado directamente del líquido de cultivo en vez de transferir los bacilos a solución fisiológica. Otro medio que puede ser empleado para crecimiento rápido es el medio albúmina-ácido oleico. Las diluciones se preparan así:

Dilusión I.—5 miligramos de bacilos por cc. de suspensión;

Dilusión II.—Transferir 1 cc. de dilución I a un tubo con 4 cc. de solución fisiológica, lo que hace un miligramo de bacilos por cc. de suspensión;

Dilusión III.—Un centímetro cúbico de dilución II a un tubo que contenga 9 cc. de solución fisiológica, lo que da una dilución de 0.1 miligramo de bacilos por centímetro cúbico de suspensión.

COLONIAS DISGONICAS, HUMANAS O BOVINAS

Inocular un cobayo por vía subcutánea con 1 cc. de dilución II (1 milig.) Inocular un conejo en la vena marginal de la oreja con 1 cc. de dilución III (0.1 milig.)

Aviar.—Inocular un pollo interperitoneal con 1 cc. de dilución I (5 milig.)

Saprófitos.—Inocular un cobayo, subcutánea, con 1 cc. de dilución I (5 milig.)

Siempre se deben hacer subcultivos de las colonias con las cuales se inoculan los animales de manera que las inoculaciones puedan ser repetidas cuando sea necesario, informar la virulencia de los cultivos y poder comparar las colonias con los resultados de los animales.

Autopsias.—Las directivas para las autopsias fueron anteriormente explicados. Seguir los mismos procedimientos para hacer extendidos y cultivos. El cobayo es muy sensible a la tuberculosis humana y bovina y se deben esperar resultados marcados. El animal debe ser sacrificado y autopsiado 42 días después de la inoculación. Aparece un abceso subcutáneo en el sitio de la inoculación y existe una tuberculosis generalizada con agrandamiento de los ganglios linfáticos, lesiones visibles en el pulmón, bazo, hígado y otros órganos. El animal muere entre seis y quince semanas; sin embargo, después de cuatro semanas, cuando el animal muestra una reacción positiva a la tuberculina puede ser sacrificado y autopsiado. La enfermedad está caracterizada por una respuesta inflamatoria progresiva, en la cual las lesiones se hacen nodulares y caseosas, el bazo e hígado se agrandan y tienen lesiones necróticas amarillentas, y los ganglios se hacen grandes y caseosos. Los pulmones pueden tener tubérculos que tienen el aspecto de pequeñas masas gelatinosas. La inyección intra-peritoneal es seguida por la muerte en dos o tres semanas y se encuentra una lesión caseosa en la pared abdominal; por otro lado la patología es similar a la de los animales inoculados por el método sub-cutáneo. El conejo es susceptible al tipo bovino de tuberculosis, pero es marcadamente resistente al humano. El conejo inoculado con el tipo bovino desarrolla una tuberculosis generalizada progresiva que es habitualmente fatal entre tres y seis semanas, en tanto que aquellos inoculados con el bacilo humano sobreviven y son sacrificados después de tres meses. Las lesiones encontradas en los pulmones de los conejos infectados con tipo bovino se parecen o asimilan a las encontradas en el hombre. Existen numerosos tubérculos grises y nódulos en el pulmón. Los ganglios están a veces agrandados y se encuentran tubérculos en los riñones, hígado, bazo. Si bien el tipo humano nunca da lugar a un tipo de tuberculosis miliar aguda, como la da el bovino, algunos tubérculos y necrosis pueden aparecer en pulmones y riñón.

Los bacilos aviar son los más virulentos para el conejo que los humanos. Producen una enfermedad tipo Yersin con proliferación de bacilos y producción de numerosos tubérculos microscópicos.

El pollo es altamente susceptible al bacilo aviar. Se desarrolla una infección generalizada, el pollo se adelgaza y muere en tiempo variable. Existen lesiones y necrosis en los ganglios mesentéricos, bazo, hígado y riñones. El pollo cuando queda vivo debe ser sacrificado a los noventa días. Se deben practicar extendidos y cultivos de las lesiones tuberculosas, siguiendo la técnica dada por el test de virulencia. Cuando los resultados son dudosos la inoculación animal debe ser repetida, utilizando cultivos frescos.

VALORACION DE LOS INFORMES DEL LABORATORIO

En cualquier enfermedad el procedimiento diagnóstico perfecto es el diagnóstico bacteriológico. Esto es especialmente cierto en tuberculosis donde los hechos radiológicos y manifestaciones clínicas pueden ser similares a otras enfermedades pulmonares. El aislamiento y la identificación del bacilo tuberculoso del huésped afectado da certeza al diagnóstico de tuberculosis sin dar importancia a otros datos presuntivos, clínicos o de laboratorio. Con el objeto de asegurar el diagnóstico de tuberculosis la radiología y los hechos clínicos deben ser relacionados con los hechos del laboratorio. No es suficiente revelarla por la radiología o por los hechos clínicos aislados o sólo por la demostración de bacilos ácido-resistentes en el extendido hecho a partir de materiales patológicos. Estos deben ser confirmados por el aislamiento de los organismos infectantes por cultivos o por la reproducción de la enfermedad en un animal susceptible, por inoculación del material infeccioso del paciente. Existen varias enfermedades que pueden simular tuberculosis ya sea en el aspecto clínico o en el radiológico.

Algunas de ellas son bronqueotáceas, neumonía crónica, silicosis, enfermedades similares provocadas por inhalación continua de sustancias irritantes, carconomas bronquial e infecciones pulmonares por levaduras y hongos como la coxidiosis, etc.

Pueden ser sospechadas después de cultivos continuados para bacilos ácido-resistentes y negativos. Las enfermedades micósicas ocurren mucho más frecuentemente de lo que se supone y no pueden durante mucho tiempo más, ser consideradas como enfermedades raras. En nuestros días la medicina aumenta su interés por otras afecciones pulmonares que no son tuberculosas. Ocasionalmente la tuberculosis pulmonar es diagnosticada por exámenes bacteriológicos en pacientes que son negativos a la radiología. Esto puede ocurrir a causa de que la enfermedad desarrolla agudamente. Porciones de campo pulmonar pueden ser tapadas por el corazón diafragma, esqueleto etc., velando las lesiones, y además, la tuberculosis extrapulmonar no puede ser revelada por esas placas.

A causa de la frecuente presencia de bacilos ácido-resistentes no patógenos en los esputos, en las secreciones nasales, contenidos gástricos, orinas y otras secreciones del organismo, la presencia de bacilos ácido-resistentes en los extendidos sin confirmación por los cultivos o por la inoculación, no merecen confianza y no pueden ser considerados como diagnósticos. A causa de la morfología variable de los ácido-resistentes en los extendidos y la similitud del aspecto morfológico de los diferentes tipos no se puede hacer diferenciación, —entre formas patógenas y no patógenas por el examen microscópico directo. De este modo la demostración de los bacilos ácido-resistentes en los frotis puede ser considerada solamente como una presunción de tuberculosis. El bacilo es demostrado con mayor frecuencia por los cultivos que por la obser-

vación. Una concentración aproximada de cien mil bacilos por centímetro cúbico de esputos es necesaria para que un bacilo pueda ser visto en un frotis, en tanto que el organismo puede ser cultivado cuando sólo pocos bacilos se encuentran presentes en la muestra.

Existen tan pocos bacilos en el contenido gástrico que no vale la pena efectuar extendidos de esas muestras. Sólo las muestras que contengan un gran número de bacilos son positivas por la microscopía directa. De ahí se desprende que la confianza en la demostración de ácido-resistentes en los frotis, sin confirmación por cultivos, puede no sólo dar falsos resultados por la apariencia de los ácido-resistentes no patógenos sino que puede conducir a resultados negativos falsos, debido a la escasa cantidad de bacilos para que puedan ser observados por el método de los frotis.

En adición al papel importante que tiene el laboratorio en el diagnóstico, lo tiene también en el tratamiento de la enfermedad. No sólo la demostración del bacilo o la necesidad del tratamiento en el paciente, sino que después de haber sido iniciado, investigaciones regularmente practicadas del mismo, muestran el efecto del tratamiento. En tanto el paciente continúa descargando bacilos tuberculosos, o su número eliminado ha disminuido o que el paciente no los elimine, resulta siempre importante para el médico, como indicación del resultado del tratamiento.

Aun cuando el paciente no los elimine más y tenga una tuberculosis detenida es importante continuar las investigaciones con intervalos anuales. Cuando después de tres años los exámenes para el bacilo tuberculoso han sido negativos, el paciente es considerado como curado.

En los años recientes una variedad de drogas han sido encontradas que son efectivas en el tratamiento de la tuberculosis. Sin embargo, después del contacto del bacilo, con ellas algunos de los bacilos, desarrollan resistencia hacia el medicamento. Algunos bacilos pueden hacerse dependientes de la droga para desarrollar. Con el objeto de conocer si el bacilo es resistente a la droga que ha sido utilizada en el tratamiento o si la droga es efectiva para inhibir el organismo, se pueden practicar test de resistencia al antibiótico. Se ha visto que los bacilos eliminados por el paciente que es tratado con estreptomycinina pueden presentar resistencia en grados variables. En la misma especie pueden encontrarse organismos realmente sensibles, organismos resistentes y organismos dependientes. Con el objeto de que la estreptomycinina pueda ser utilizada con efectividad al bacilo debe ser sensible a 10 microgramos de estreptomycinina por centímetro cúbico de medio. Cuando sólo algunos pocos bacilos son resistentes, no hay indicación para que el tratamiento se suspenda puesto que la mayor parte de ellos son inhibidos por la droga.

El laboratorio puede practicar test de sensibilidad utilizando otros antibióticos que son empleados para el tratamiento y con drogas semejantes al ácido para aminosalicílico.

El examen que practica el laboratorio en las muestras patológicas de los pacientes es de tan real importancia que eclipsa el significado de todos los otros procedimientos. Las razones pueden resumirse del siguiente modo:

- 1) El único procedimiento para establecer el diagnóstico de una enfermedad con certeza es por la demostración de agente etiológico;
- 2) La demostración del bacilo tuberculoso es un procedimiento rápido e importante de diagnóstico;
- 3) El aislamiento del bacilo tuberculoso indica que el paciente los elimina y muestra la necesidad del tratamiento;
- 4) Exámenes con resultados negativos son necesarios como una indicación de la eficacia del colapso o de otro tipo de tratamiento;
- 5) Los exámenes del bacilo tuberculoso dan un índice pronóstico para el paciente;
- 6) Los hechos negativos del laboratorio son un criterio importante para descartar tuberculosis pulmonar y obtener el diagnóstico correcto.
- 7) Los test de sensibilidad a la droga dan una indicación de la eficacia del tratamiento.

TEST DE SENSIBILIDAD

Se pueden hacer test de sensibilidad para los antibióticos o drogas que se emplean en el tratamiento. Pueden practicarse directamente de los sedimentos de las muestras tratadas y neutralizadas, cuando hay suficiente número de bacilos presentes, o pueden practicarse a partir de los cultivos de esas muestras. Se debe siempre hacer un cultivo de manera que el test pueda ser repetido cuando no es satisfactorio. El método directo (siembra de las muestras) es preferible a los test a partir de cultivos porque los resultados son obtenidos más rápidamente y tienden a dar una información más segura de la sensibilidad del organismo a la droga. El crecimiento sobre medios artificiales anteriores al test puede cambiar la proporción de organismos resistentes y sensibles presentes en la muestra en el momento que se elimina por el paciente. Para la siembra directa para los medios sólidos son preferibles a los líquidos. No es posible standarizar el número de bacilos de la muestra cuando se practica el test directo, en tanto que cuando se cultiva primero, y el test se practica a partir del cultivo, las siembras pueden ser medidas. Se practica una observación primero y cuando se observen bacilos en regular número se puede practicar un test directo. Al mismo tiempo se hace un cultivo para utilizarlo en el caso de que el test directo no sea satisfactorio o se contamine.

PREPARACION DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Medio de Peizer y Sheter.—Este medio se ha mostrado conveniente para medir la sensibilidad. El crecimiento es rápido y abundante. Se prepara fácilmente y sirve para los distintos tipos de bacilos aunque se realizan las siembras con poca cantidad. Puede conservarse dos meses sin inconvenientes.

Agar base:

Extracto de carne	3	gr.
Hidrolizado de caseína (caso amino-ácido).....	10	gr.
Almidón de patata.....	15	gr.
Asparragina	3	gr.
Fosfato de potasio (dibásico).....	3.5	gr.
Citrato de hierro amoniacal.....	0.1	gr.
Acido Cítrico	0.1	gr.
Sulfato de magnesia	0.015	gr.
Agar.....	15.0	gr.
Agua destilada	1000.0	cc.

Colocar todos los ingredientes en un Erlemmeyer y mezclar bien, calentar agitando siempre en baño maría hasta que la mezcla se espese. Esterilizar a 15 libras 15 minutos. Enfriar a 55 grados y agregar el enriquecimiento. Cuando se practican test de sensibilidad agregando, diluciones de drogas al medio se prepara el Agar-Base en cantidad de 100cc. en frascos de Erlemmeyer de 250 cc. Este agar puede obtenerse en forma deshidratada de Difco, con el nombre de «Peizer T. B. Medium Base».

Enriquecimiento:

Yemas de huevos (estérilmente).....	10
Solución fisiológica	25 cc.
Glicerina	40 cc.
Solución estéril de verde malaquita al 1%...	13 cc.
Solución estéril de dextrosa al 20%.....	1 cc.

Agitar bien los huevos con la solución fisiológica antes de agregar la glicerina y el verde malaquita. Agitar bien esta mezcla antes de agregar la gel-agar base que ha sido enfiada a 55 grados. Agregar 29cc. por cada 100cc. de agar-base. Este enriquecimiento puede ser obtenido en frascos estériles de 29cc. de Difco bajo el nombre de Peizer T. B. Medium Enrichment. Preparación de los huevos frescos. Lavarlos con agua jabonosa y enjuagarlos con agua. Dejarlos en alcohol a 70 durante 30 minutos y secarlos entre dos paños estériles. Lavarse las manos con jabón y agua y enjuagarse con alcohol a 70. Tomar el

huevo por el medio, flamear cada extremo y agujerearlo con un forceps estéril. Se descarta el blanco y se flamean los extremos. Agitar el amarillo en un embudo estéril que ha sido colocado en la boca de un frasco de Erlenmeyer de 250cc. Tapar el embudo con papel estéril y levantarlo cada vez que pasa el huevo. Cuando se practica el test de sensibilidad utilizando la droga agregada al medio, incorporar la dilución de droga apropiada a cada frasco de 100cc. de agar-base antes de que se agregue el enriquecimiento. Agregar éste, mezclar y distribuir 8cc. en tubos. Inclinar, dejar solidificar. Incubar las 24 horas para esterilidad y guardar en la refrigeradora. Cuando se emplean los discos de sensibilidad en vez de diluciones de drogas incorporadas al medio en cajas de Petri e incubar para esterilidad y guardarlos envueltos (para desecación) con papel estéril para evitar también contaminaciones, puesto que las bacterias y hongos pueden penetrar por los bordes.

Peizer, preparado para base y enriquecimiento

Difco Bacto Peizer T. B. Medium Base... 5 gr.
 Agua destilada 100 cc.

Suspender el medio base destilada y calentar en baño maría, hirviendo, para disolver el medio completamente. Repartir en cantidades de 100cc. en frascos de Erlenmeyer de 250cc., esterilizar a 15 libras 15 minutos. Enfriar a 50 grados y agregar el contenido de un bote (29 cc.) del Bacto Peizer, T. B. Medium Enrichment a cada 100cc. de base disuelto. Mezclar bien y distribuir en cajas de Petri.

Cuando se emplean diluciones de drogas, agregarlas a la base antes del enriquecimiento; enfriar, probar esterilidad y guardar en el refrigerador.

Medio de Herrold modificado.—Agar amarillo de huevo

Agar Base:

Difco Nutrient Agar, deshidratado 23 gr.

O si no:

Extracto de Carne Bacto 3 gr.
 Bacto Peptona..... 5 gr.
 Bacto Agar 15 gr.
 Glicerina 10 cc.
 Verde malaquita, solución acuosa al 2% 10 cc.
 Agua destilada..... 750 cc.

Fundir la mezcla en baño maría y distribuir 150cc. en frascos de 250cc.

Esterilizar a 15 libras 15 minutos. Enfriar a 50 grados y agregar la dilución de droga a cada frasco. Agregar 50cc. de amarillo de huevo a cada frasco usando la técnica descrita para el Peizer. Mezclar bien y envasar de 5 a 8cc. en tubos.

Test de sensibilidad para la estreptomocina

Métodos de los Discos.—Los discos pueden ser obtenidos conteniendo tres diluciones de estreptomocina. Discos de uno a dos microgramos, de 10 microgramos y de 100 microgramos.

Este método no es tan sensible como cuando se emplea la dilución de droga en el medio pero es satisfactorio y lleva menos tiempo.

1) Preparar Peizer o Herrold y repartir en cajas de Petri.

2) Preparar las muestras utilizando NAOH al 4%.

3) Sembrar uno o dos tubos de Lowestein con el sedimento neutralizado que serán utilizados si el test se repite.

4) Sembrar una placa con lo que queda del sedimento y extenderlo uniformemente sobre la superficie, utilizando una varilla de vidrio de 4 milímetros de diámetro y de 7 pulgadas de largo. A las dos pulgadas del extremo doblarla en un ángulo de 90 grados y nuevamente a una pulgada del extremo en otro ángulo de 90 grados, siendo la parte más larga la que se empleará como mango. Pulir los extremos de la varilla. La parte de una pulgada, que es paralela al mango, debe ser la utilizada para extender.

Emplear pinza estéril, colocar los discos sensibles, 1 microgramo, 10 microgramos, y 100 microgramos sobre la superficie del medio, teniendo cuidado de que estén bien separados uno del otro a 3 cms. La placa será marcada en el fondo en 4 cuadrantes con lápiz graso, el primero para control, sin disco; el 2o. para el de un microgramo; el 3o. para el de 10 y el 4o. para el de 100 microgramos. Después de colocar los discos de la superficie del medio, cerrar los bordes de la cápsula con parafina o con scotch tape, para prevenir contaminaciones y desecación. Leer las cajas después de 7, 10 y 14 días de incubación a 37° C. Si bien el crecimiento suficiente se hace visible de 10 a 14 días, se requieren 21 días; el grado de sensibilidad está determinado por la zona de inhibición al rededor de los discos. Los bacilos completamente sensibles producen inhibición alrededor de los tres discos. Los completamente resistentes no muestran zonas de inhibición, excepto, sin embargo, al rededor del disco de 100 microgramos, informar del modo siguiente:

Completamente sensible a 1 mcgm. (inhibición en los 3 discos).

Parcialmente sensible a 1 mcgm. (pocos bacilos alrededor de 1 e inhibición alrededor de 10 y 100 mcgms.)

Completamente sensible a 10 mcgms. (no inhibición en 1 y sí en 10 y 100.)

Parcialmente resistente a 10 mcgms. (zona parcial de inhibición en 10 y zona de inhibición en 100 mcgms.)

Resistentes a 100 mcgms. (no hay zona de inhibición,)

Cuando no hay suficiente crecimiento de la placa para un test satisfactorio, repetirlo empleando colonias de los tubos de Lowenstein, que fueron sembrados al mismo tiempo.

Método de los discos con cultivo:—Tomar varias colonias de mycobacterium tuberculosis de un tubo de Lowenstein y transferir a un tubo con dos o tres gotas de agua destilada. Emulsionar, agregar 1 cc, de agua destilada para hacer una buena suspensión, sembrar en placa (POH) y extender con la varilla de vidrio.

Dilusión de la Estreptomina para el medio de Herrold

Agregar 4 cc. de agua destilada estéril a un gramo de dihidroestreptomina y mezclar bien. Esta solución contiene 200,000 mcgms. de estreptomina por centímetro cúbico. De esta solución hacer las siguientes diluciones:

Dilusión I.—1 cc. de solución madre más 9 cc. de agua destilada; mezclar ésta, conteniendo 20,000 mcgms. por cc.

Dilusión II.—1 cc. de dilusión I más 9 cc. de agua destilada; ésta contiene 2,000 mcgms. por cc.

Dilusión III.—2 cc. de dilusión II más 8 cc. de agua destilada; ésta contiene 400 mcgms. por cc.

Preparar el medio de Herrold como se ha dicho; enfriar la base a 50° — 55°. — Para el frasco control agregar el huevo sin adición de droga.

Frasco II.—Agregar 1 cc. de dilusión III (400 mcgms.); agregar los huevos y mezclar. Tubos marcados con 2 mcgms.

Frasco III.—Se agrega 1 cc. de dilusión II (2,000 mcgms.) Mezclar y agregar los huevos. Tubos marcados 10 mcgms.

Frasco IV.—Se agrega 1 cc. de dilusión I (20,000 mcgms.) Agregar huevos y mezclar. Tubos marcados 100 mcgms.

Dejar enfriar, acostados, e incubar por control 24 horas a 37°. Sembrar los tubos con el sedimento neutralizado utilizando la misma cantidad para cada uno o preparar suspensiones de bacilos a partir de las colonias. Cuando el test se practica con un cultivo, tomar varias colonias, emulsionarlas en 1 tubo con 1 o 2 gotas de agua destilada; agregar 1 o 2 cc. de agua destilada, hacer una buena emulsión y sembrar en cada tubo 0.1 cc. de la emulsión.

Dejar acostado 24 horas en la estufa. Dejarlos después verticales. Examinar después de 7, 10, 14, 21 y 28 días.

Informar solamente cuando hay 25 colonias en el control. Cuando el crecimiento es muy confluyente, repetir el test utilizando un nuevo cultivo, fresco.

El crecimiento del tubo control puede ser utilizado para repetir el test. Informar la sensibilidad del modo siguiente:

Sensible a 2 mcgms. crecimiento solo en el control parcialmente; resistente a 2 mcgms. sensible a 10 (poco desarrollo en 10). Parcialmente resistente en 10 mcgms. y sensible en 100. Completamente resistentes a los 100 mcgms. (cuando hay igual cantidad de desarrollo en los cuatro tubos).

Dilusiones de estreptomicina para el Peizer. Agregar 6.2 cc. de agua destilada a 1 gramo de estreptomicina (dihidro); mezclar bien; esto hace una dilusión que tiene 130.000 mcgms. por centímetro cúbico.

Dilusión I.—1 cc. de solución madre más 9 cc. de agua destilada (contiene 13.000 mcgms. por cc.)

Dilusión II.—1cc. de DI más 90cc. de agua destilada (contiene 1,300 mcgms. por cada cc.)

Dilusión III.—2cc. DII más 8cc. de agua destilada (contiene 260 mcgms. por cc.)

Control.—Marcar 1 frasco control y agregar 29cc. de enriquecimiento a 100cc. de Agar=Base; mezclar y envasar en tubos marcados control.

Acostarlos, incubar 24 horas y pasar a la refrigeradora.

Frasco I.—2 mcgms. por cc. Agregar 1cc. de DII (a los 100cc. de Agar=Base). Agregar el enriquecimiento y mezclar (contiene 2 mcgms. por cc.)

Frasco II.—10 mcgms. por cc. Agregar 1cc. de DII al Agar=Base, luego enriquecimiento y mezclar (contiene 10 mcgms. de cc.)

Frasco III.—Agregar 100cc. de DI al Agar=Base; agregar el enriquecimiento y mezclar.

Guardar todos los medios en la refrigeradora.

PAS Ácido paraamino salicílico.—Test de sensibilidad.

Utilizar la misma técnica que para titular la sensibilidad ha sido dada para la estreptomicina, excepto en lo que se refiere a la dilusión de la droga. Las dilusiones de la droga deben ser agregadas a los frascos de medio en tal forma que las concentraciones finales sean de 10 miligramos, y 1.0 miligramos por 100cc. de medio. Preparar una solución madre de Pas agregando 200 miligramos de Pas a 9cc de agua destilada estéril. Esta solución se mantiene estable en la heladora una semana. Preparar dilusiones.