

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS QUIMICAS

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE DIFERENTES
BACIOS ACIDO ALCOHOL RESISTENTES
EN EL MEDIO DE DUBOS



TESIS

presentada para examen profesional de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

RUTH ALONSO DE LA FUENTE



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Al Dr. Alberto Monnier M.

A la Unidad de Nomenclatura

*A O. M. del Seguro Social
donde fue hecho este trabajo*

A mis maridos

Al H. Juanda.

A mis amigos y compañeros

A la memoria de mi Padre

Con cariño a mi Madre

A mis hermanos

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE DIFERENTES BACIOS ACIDO ALCOHOL RESISTENTES EN EL MEDIO DE DUBOS

Mostrer 19 en México desde 1947 se creó 700 cultivos de material proveniente de diferentes cepas y 400 cultivos de material de enterococos de las cepas de número 50 cepas de bacilos de ácido alcohólico resistente en un suero que se usó de *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis* cepas presentan caracteres diferentes más o menos entre unas y otras. Sin embargo antes de describirlos detalladamente se han estudiado con mayor propiedad y detalle en el medio de Dubos y de ellas se encuentran en estado de pureza y se creó en algunas hasta 70 cepas y se les ha estudiado desde diferentes puntos de vista.

En 1946 Tuller y colaboradores (14) publicaron trabajos basados en el estudio del metabolismo de los bacilos de ácido alcohólico resistentes y en el interés de los investigadores en el estudio de los caracteres de estos organismos cuando se cultivan en el suero de la Jca. Moctezuma cuando por estar en contacto filten muchas pruebas para demostrar un posible parentesco filogenético de estos organismos con el

MATERIAL Y METODOS

1. Empleamos 20 cepas de organismos de ácido alcohólico resistentes en la de material leproso y en todas se conservaron en medio de Lowenstein-Jensen con 1% de malapita y 2 cepas de bacilos tuberculosos como controles, conservadas sobre el mismo medio.

En los cuadros I, II y III están anotados los caracteres biológicos morfológicos, de crecimiento, caracteres comunes y diferenciales de todas las cepas estudiadas.

2.—Los inóculos fueron hechos con cultivos de 2 semanas, salvo para la cepa BH-10 que fué 4 semanas, se les suspendió y molió con canicas homogeneizándolas, dejando asentarse, usando solamente el sobrenadante con una opacidad correspondiente a 50 millones de proteu X-19-0 c.c., determinada por foto-nefelómetro.

3.—Se prepararon tubos con medio de Dubos de la siguiente manera:

A.—En tubos pyrex de 25 mm. se puso 5.7 c.c. (3) de la solución preparada así:

Fosfato disódico con 12 moléculas de H ₂ O	63 gr
KH ₂ PO ₄	10 gr.
Na citrato con 2H ₂ O	1.5 gr.
Disuélvase y entonces añéque	
Citrato de hierro y amonio	0.1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.6 gr
Tween 80	0.5 gr
H ₂ O destilada p.	1000 cc

Su reacción final debe ser de un pH de 6.8 a 7.0

B.—Se le sometió a la autoclave a (15 lbs) 6.80 Kg. 20' min.

C.—A cada tubo se le añadió **estérilmente** 0.3 c.c. de una solución acuosa de fracción V de seralbúmina de buey filtrada a través de un filtro Whatman No. 1.

4.—Para la elaboración de este medio fueron empleadas sales químicamente puras, agua destilada y la fracción V de seralbúmina de buey, aislada por los fabricantes por digestión triptica. El Tween 80. (Este producto es manufacturado por el Atlas Powder Co. Wilmington, Delaware). Tween 80 es un derivado polioxietileno del mono oleato de sorbitan el cual es completamente soluble en

agua y estable al calor. Tween 80 es una sustancia de superficie activa caracterizada por la posesión de propiedades lipofílicas e hidrofílicas, las primeras determinadas por la cadena larga alifática de los ácidos grasos y las segundas debidas a los grupos que contienen oxígeno de los alcoholes polihídricos y de la cadena anillo etileno (4). Tween 80 según Dubos es realmente adsorbido sobre la superficie hidrofílica de los bacilos tuberculosos y sus efectos de tensión superficial en distribución difusa del organismo en el medio acuoso, ocasiona al moverse la superficie bacteriana localiza cambios entre el organismo y el medio que lo rodea y así aumenta la velocidad de crecimiento. Las sustancias tensioactivas no sólo como una sustancia tensioactiva, sino también contribuye positivamente a la nutrición de la célula bacteriana por suministrar el modo graso en una forma adecuada (4).

5.—Se tuvo especial cuidado en lavar las placas de algodón en vueltas con agua para evitar pelusas que en opinión de Dubos (3), pueden inhibir el crecimiento de los *Mycobacterium*.

6.—Cada tubo fue inoculado asepticamente con 0.1 c.c. de suspensión correspondiente a un tipo de bacteria.

7.—Fueron incubados a 37°C durante 15 días y hechos controles bacteriológicos en los 14 días.

8.—Se hizo control bacterioscópico y subcultivos en medio de Lowenstein-Jensen a 37°C. Para tener resultados comparables, en una sola lámina se sembraron varias divisiones con igual graso y en cada una de ellas se hizo un pequeño trozo correspondiente a cada uno de los tubos en estudio, la lámina fue sometida al procedimiento de coloración por el método clásico de Ziehl-Neelsen (5) y de esta manera todas las bacterias sufrieron las mismas maniobras al mismo tiempo y en condiciones idénticas de manera parecida empleamos el método de Gram, por Berke (6).

9.—Todo el material de vidrio se lavó con abundante jabón y agua corriente.

10.—Se enjuagó con agua destilada y se sometió a 15 libras (6.80) por 20' en autoclave.

11.—Se esterilizó con formalina al 10% el producto patológico y al autoclave a 120°C el material de uso.

En los cuadros I, II y III están anotados los caracteres biológicos morfológicos, de crecimiento, caracteres comunes y diferenciales de todas las cepas estudiadas.

2—Los inóculos fueron hechos con cultivos de 2 semanas, salvo para la cepa BH-10 que usé 4 semanas, se les suspendió y molió con canicas homogeneizarlas, dejando asentarse, usando solamente el sobrenadante con una opacidad correspondiente a 50 millones de protei X-10-C c.c., determinada por foto-nefelómetro.

3—Se prepararon tubos con medio de Dubos de la siguiente manera

A—En tubos pyrex de 25 mm. se puso 5-7 c.c. (3), de la solución preparada así:

Fosfato disódico con 12 moléculas de H ₂ O	63 gr
KH ₂ PO ₄	10 gr
Na citrato con 2H ₂ O	1.5 gr
Disuelva y entonces agregue	
Citrato de hierro y amonio	0.1 gr
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.6 gr
Tween 80	0.5 gr
H ₂ O destilada y p. i.	1000 c.c.

Su reacción final debe ser de un pH de 6.8 a 7.0

B—Se le sometió a la autoclave a (15 lbs.) 6.80 Kg.), 20' min.

C—A cada tubo se le añadió **estérilmente** 0.3 c.c. de una solución acuosa de fracción V de seroalbúmina de huey filtrada a través de un filtro Neus al vacío (17.)

4—Para la elaboración de este medio fueron empleadas sales químicamente puras, agua destilada y la fracción V de seroalbúmina de huey, aislada por los fabricantes por digestión tripsica. El Tween 80. (Este producto es manufacturado por el Atlas Powder Co. Wilmington, Delaware). Tween 80 es un derivado polioxietileno del mono oleato de sorbitan el cual es completamente soluble en

agua y estable al calor. Tween 80 es una sustancia de superficie activa caracterizada por la posesión de propiedades lipofílicas e hidrofílicas, las primeras determinadas por la cadena larga alifática de los ácidos grasos y las segundas debidas a los grupos que contienen oxígeno de los alcoholes polihídricos y de la cadena corto etileno (1). Tween 80 según Dubos es realmente adsorbido sobre la superficie hidrofóbica de los bacilos tuberculosos y sus efectos de tensión superficial le distribuyen difusa del organismo en el medio acuoso, además al mejorar la superficie bacteriológica cambios entre el organismo y el medio que lo rodea y así aumenta la velocidad de crecimiento. La sustancia anterior actúa no solo como una sustancia tensante, sino también contribuye positivamente a la actividad de la célula bacteriológica por suministrar el todo graso en una forma adecuada (2).

5—Se tuvo especial cuidado en lavar tapones de algodón envueltos con agua para evitar pelusas que en opinión de Dubos (3), pueden inhibir el crecimiento de los *Mycobacterium*.

6—Cada tubo fue inoculado asépticamente con 0.1 c.c. de suspensión correspondiente a un tipo de bacteria.

7—Fueron incubados a 37°C durante 15 días y hechos controles intermitentes cada 24 hs.

8—Se hizo control bacterioscópico y subcultivos en medio de Lowenstein cada 24 hs. Para tener resultados comparables, en una sola lámina se hicieron varias divisiones con 10µl graso y en cada una de ellas se hizo un pequeño inóculo correspondiente a cada uno de los tubos en estudio, la lámina fue sometida al procedimiento de coloración por el método clásico de Hehl Neelsen (4) y de esta manera todas las bacterias siguieron las mismas maniobras, al mismo tiempo y en condiciones idénticas, de manera patenta empleamos el método de Gram, por Burke (5).

9—Todo el material de vidrio se lavó con abundante jabón y agua corriente.

10—Se enjuagó con agua destilada y se sometió a 15 libras (6.80) por 20' en autoclave.

11—Se esterilizó con formalina al 10% el producto patológico y al autoclave a 120°C el material de uso.

12.—Se usó el medio Lowenstein preparado según el Manual del Instituto Pasteur.

13.—Se siguió la técnica general bacteriológica propuesta por Wadsworth (7).

CUADRO I

CARACTERES BIOLÓGICOS GENERALES DE CADA CEPA

Para sistematizar mejor la descripción de las cepas seguiremos arbitrariamente el siguiente esquema:

- a.—Procedencia del cultivo y número de generación
- b.—Forma y pigmentación de las colonias
- c.—Variación de las colonias
- d.—Estado de la superficie de las colonias
- e.—Descripción de la evolución de las colonias en el tiempo
- f.—Frecuencia de los subcultivos
- g.—Temperatura óptima de desarrollo

bH1.—Análisis de moco nasal, se hace el estudio en la 73ª generación desde su aislamiento como cepa pura. Las colonias se difunden en el medio haciéndose confluentes casi como manchas vuca el color del medio va de amarillo oscuro a naranja oscuro a las 96 hs. y completan su desarrollo hacia los 120 días. Desde el principio toma un color fuertemente naranja oscuro.

bH2.—Análisis de hula por raspado de piel, crece en forma de colonias aisladas, teniendo prominencia en el medio, en forma y contornos irregulares de pigmentación crema, que al envejecer vira a naranja oscura, vuca el medio naranja, las colonias con S. Se hacen confluentes formando una película. Se siembra cada 30 días. Su temperatura óptima es de 37°C. No todas las colonias evolucionan al mismo tiempo, mientras hay algunas de 2 a 4 mm. de diámetro a las 120 hs. otras apenas empiezan a crecer. Posteriormente se hacen confluentes. 57 generación.

bH3.—Proceden de lepromas, forman colonias como de 1 mm. con bordes netos, la colonia hace prominencia en el medio tomando su centro un color café mientras los bordes son color crema. Vira el medio a amarillo. El desarrollo comienza hacia el séptimo día, son colonias S. Rara vez las colonias se hacen confluentes, se resiembró cada 30 días. Temperatura óptima 37°C. 68 generación.

bH4.—Proceden de líquido de exúviver leproso. Tienen forma circular muy pequeña de 0.5 a 1 mm., hacen prominencia en el medio tendiendo hacerse esféricas, se unen unas a otras formando colonias alargadas, decolitas el medio y al envejecer pasan de color blanco mate a rubio de rosa. Temperatura óptima 30°C. Resiembró cada 45 días. Subcultivo 57.

bH5.—Se obtuvo de piel infiltrada de un caso lepromatoso difuso. El crecimiento comienza hacia los 7 días de incubación dando colonias B en forma de cáscaras. Al principio son de color amarillo pálido, volviéndose de rosa a medida que pasa el tiempo. El medio se vuelve amarillo. Resiembró cada 45 días. Temperatura óptima 37°C.

bH6.—Aislado de moco nasal, crece en forma de hula. El crecimiento con la superficie del medio al que decolora fuertemente en amarillo, el desarrollo usualmente se presenta hacia las 120 hs., parece detenerse unos diez días, entón se comienza a invadir toda la superficie del medio, se resiembró cada 30 días. Temperatura óptima 37°C. Subcultivo 30.

bH7.—Aislado de una lesión escrota de un sudador, se les urella muy lentamente, aparecen las primeras colonias hacia el sexto día de la siembra, entón alrededor de la primera colonia que es amarilla, empiezan a aumentarse en número otras colonias del mismo tamaño y aspecto pero de color rojo. El desarrollo máximo se obtiene a los 45 días y entón se le resiembró. No cambia el color del medio. Subcultivo 47. Temperatura óptima 37°C.

bH8.—Procedente del pulmón de un cadáver leproso desarrollado en simbiosis con una levadura. Muy difícil de aislar, se logró la cepa pura al hacer actuar ácido sulfúrico el 10% durante



media hora, centrifugado y lavado con una solución de bicarbonato de sodio, del sedimento, solo creció este germen. Hacia las 24 hs., crecen numerosas colonias tipo S, redondas, de bordes lisos que se hacen esféricas como de 0.25 cm. de diámetro; de color crema que se hacen fácilmente confluentes invadiendo el medio el que vuelven amarillo. Replantea cada 30 días. Temperatura óptima 37°C. Subcultivo 17.

bH9.—Aislada de lepromas, crecen en 48 hs., en aspa, dando la impresión de grasa, tienen un pigmento naranja muy intenso. No cambia el medio. Temperatura óptima 25°C. Subcultivo 71.

bH10.—Aislada de una resembra de huevo inoculado con lepromas. Colonias de tipo R que desarrollan con extraordinaria lentitud a veces hasta 30 días, dan alguna colonia o dos en cada tubo con caracteres muy semejantes a los cultivos del bacilo tuberculoso, son de color blanco, no cambia de color el medio, una vez en algún tubo las colonias han llegado a tener hasta 5 mm. de diámetro. Es a nuestro parecer el único germen de las aisladas que realmente sea *Mycobacterium leprae*, sólo se logró tener 4 subcultivos, temperatura óptima 37°C. Replantea cada 45 días.

bH11.—Aislada de leproma. Se vea el crecimiento, hacia las 48 hs., en forma de pequeño puntillo amarillo que cubre todo el medio. Poco a poco vira el medio a amarillo. Crece rápidamente hasta hacerse confluentes y forman una espesa película almidonada en el centro que toma color moreno claro, es de tipo S. Temperatura óptima 37°C. Replantea cada 30 días. Subcultivo 24.

bH12.—Aislada de leproma. Crece en forma de collier hacia los seis días, aumentando rápidamente de tamaño dando el aspecto de colonias R, son de color blanco. Algunas veces en el mismo cultivo da colonias semejantes a las anteriores pero se pigmentan de rosa. Temperatura óptima 37°C. Replantea cada 30 días. Generación 42.

bH13.—Aislada de moco nasal dan colonias muy pigmentadas de color naranja oscuro hacia los cuatro días de sembradas, son de tipo S pero no confluentes. No cambian el medio. Temperatura óptima 30°C. Replantea cada 30 días. Generación 19.

bH14.—Aislada de leproma, da abundantes pequeñas colonias a los siete días de sembradas, en grano de sémola que se pisan en rasmo, la superficie es R. Hacia los nueve días cambian de color amarillo a naranja pálido.

bH15.—Obtenida de leproma. Crece a los cinco días, como ves min. de diámetro de color salmón, bordes regulares definidos, al envejecer viran a amarillo el medio. Temperatura óptima 30°C. Replantea cada 30 días. Generación 19.

bH16.—Aislada de moco. Es semejante en todo a la cepa bH13 salvo que las colonias son más pequeñas y crece mejor a 37°C. Generación 12.

bH17.—Obtenida de leproma. Desarrolla débilmente hacia el décimo día en forma de pequeñas colonias como de un mm., con los bordes levantados, tienen tipo S y color rosa que al envejecer se vuelve moreno, viran el medio a amarillo. Temperatura óptima 37°C. Generación 13.

bH18.—Obtenida de mal perforante de pie lepromatoso. Desarrolló escaso hacia el sexto día, parece detenerse para tomar después un ritmo de crecimiento más acelerado hacia el undécimo día, las colonias de tipo S se hacen confluentes para formar una delgada aspa. Se pigmentan fuertemente de naranja opaca sin deslucir el medio. Temperatura óptima 37°C. Replantea cada 30 días. Generación 13.

bH19.—Aislada de raspado de piel y linfa, desarrolla hacia el quinto día en forma de pequeñas colonias en forma de grano de sémola, como de un mm. de diámetro y de aspecto R. A las veces se juntan, lo que rara vez se observa, dando al aspecto el de collier. Las colonias son amarillas y al envejecer toman aspecto cremoso S, y se colorean de moreno pálido. Generación 100. Temperatura óptima 37°C.

bH20.—Fue obtenida de punción de ganglio. Hacia el quinto día empiezan a formarse pequeñas puntas blancas a partir de las cuales se forma una película rugosa, opaca muy delgada, al cabo de 3 o 4 días los puntitos van creciendo hasta alcanzar un tamaño de 2 a 3 mm., de color crema, S, el medio vira a amarillo. Tempe-

ratura óptima no determinada. Resiembra cada 30 días. Generación 8.

bH21.—Obtenida por autopsia de bazo de lepromatoso con lesiones caseificadas. Semejante a la anterior, da la impresión de un cultivo de actinomicas pero no cultiva en Sabouraud; a las 95 hs. se inicia un crecimiento en película fina rugosa, formándose en los puntos de intersección de las arrugas pequeños puntitos estériles amarillos de bordes lisos bien definidos, al cabo de unos días forman colonias de aspecto de coliflor. Decoloran el medio. Generación 23. Temperatura óptima 25°C.

bH???—Aislado por autopsia de pulmón de lepromatoso. Creció al cabo de 60 días de incubación a 37°C dando cultivo escaso, en colonias R, con caracteres de bacilo tuberculoso, de color blanco, que no decoloran el medio, 4 de los 12 tubos sembrados presentan los mismos caracteres, la primera resiembra a las 95 hs. no desarrolló abundante con los mismos caracteres, manteniéndose así hasta la séptima generación que presentó desarrollo exuberante hacia las 48 hs. con una pigmentación rojo-lavilla, entonces se resiembró de algunos de los tubos de generaciones anteriores manteniéndose esta capa con caracteres idénticos hasta la actualidad (resiembra 71) pero las resiembras del cultivo pigmentado sucesivas siendo iguales a las obtenidas en la séptima generación pero a la 10a generación volvió a mutar a colonias blancas de crecimiento lento las que sin embargo arden por pigmentarse de color salmón claro por envejecimiento. De esta manera hemos obtenido de un mismo cultivo 3 distintas cepas con ciertos caracteres distintivos denominadas bH1? bH?? y bH???. Esta última la escogimos por parecernos la menos mutable. Temperatura óptima 40°C.

bH1—Bacilo tuberculoso tipo humano, obtenido de lesión ósea de un cadáver.

bH2—Bacilo tuberculoso tipo bovino aislado del esputo de un enfermo de tuberculosis.

CUADRO II

CARACTERES COMUNES DE LAS CEPAS

1.—Sólo crecen en medios especiales para bacilo de Koch, salvo el bH10 que no crece en caldo glicerinado

2.—Todas son ácido alcohol resistentes desde el punto de vista antenatal pero algunas de ellas presentan formas no ácido alcohol resistentes que en un principio fueron tomadas como contaminaciones, estudios posteriores demostraron que representan estadios evolutivos del mismo germen (3). No todas las gérmenes de distintas cepas toman el Ziehl con igual intensidad tal como queda expuesto en la tabla de caracteres diferenciales de los gérmenes.

3.—No son móviles, ni presentan flagelos

4.—No crecen en los siguientes medios:

a.—Medio simple y compuesto de Sabouraud, salvo el bH???, que crece en este medio, sembrando grandes cantidades, en forma de velo sin perder sus caracteres a a :

b.—Gelosa y caldo simple

c.—Placa de gelosa sangre

d.—Gelosa triptica

e.—Gelatina

f.—Caldo con cubos de albúmina de huevo coagulada por el calor, salvo las cepas bH17 y bH2 que crecen con mucha dificultad en aerobiosis.

Todas las cepas probadas con estos medios en aerobiosis, anaerobiosis, tensión de CO₂ al 10%, y tensiones de mezcla de O₂ al 10% y CO₂ al 40%.

CUADRO III DE CARACTERES DIFERENCIALES DE LOS GERMENES

Cepas	Morfología	Tamaño			Formas AAR	Formas no AAR	Observaciones
		Largo	Grueso	Gran.			
2H1	Bacilos	2-4	1-3	†	x	si	Ninguna
2H2	Bacilos	2-4	1-3	†	xxx	no	Ninguna
2H3	Bacilos	3-5	2-3	†	x	no	Ninguna
2H4	B y cocos	2-5	2-3	†	xxx	no	Ninguna
2H5	Bacilos	1-3	2-3	†	xx	no	Dan impresión de cocos
2H6	B y cocos	1-2	1	†	xxx	no	Ninguna
2H7	B. Busiformes	5-7	3	†	xxx	no	Ninguna
2H8	Bacilos	3-7	1-7	†	xx	no	Dan impresión de cápsulas
2H9	Bacilos	3-5	1-2	†	x	no	Ninguna
2H10	Bacilos	2-7	1-3	†	xxx	no	Formas muy granulosas
2H11	B y cocos	3-6	2-3	†	xx	no	Ninguna
2H12	Bacilos	4-7	2-3	†	xxx	no	Ninguna
2H13	Cocobacilos	2-4	7-11	†	xxx	no	Ninguna
2H14	Bacilos	2-4	1-2	†	x	no	Ninguna
2H15	Bacilos	3-6	4-8	†	xxx	si	Ninguna
2H16	Bacilos	1-3	1	†	xxx	si	Ninguna
2H17	Cocobacilos	1-3	5-1	†	xx	si	Muy granulosa
2H18	Bacilos	4-6	4-6	†	xxx	no	Ninguna
2H19	B y cocos	1-7	2-9	†	xx	no	Estreptococo
2H20	Cocobacilos	1-3	4-5	†	xxx	no	Estreptococo más colorado centro que ext.
2H21	Bacilos	1-5	1-3	-†	xxx	no	Ninguna
2H22	Bacilos	2-4	1-3	†	xxxx	no	Ninguna
2KH1	Bacilos	2-6	1-3	†	xxx	no	Ninguna
2KB2	Bacilos	2-5	3-5	†	xxx	no	Ninguna

QUÍMICA



Explicaciones del cuadro de caracteres diferenciales de los
gérmenes:

Las medidas están expuestas en micras.

Para la coloración de Gram:

† significa que toman bien la coloración.

† — que lo toman mal.

Para la coloración de Ziehl Neelsen:

—X: Los gérmenes individualmente se tiñen con diferente
intensidad.

X: Se tiñen en rosa pálido.

X X: Se tiñen en rojo.

XXX: Se tiñen en rojo intenso y se presentan brillantes.

XXXX: Toman color púrpura.

AAR: Significan ácido alcohol resistentes.

Formas No AAR: no ácido alcohol resistentes concomitantes
con las AAR.

RESULTADOS

Se pueden observar en los cuadros lo siguiente:

- 1.—Todas las cepas se desarrollaron en el medio propuesto por Dubos para bacilos ácidos alcohol resistente.
- 2.—Por regla general no formaron grumos al crecer, salvo las cepas bH3, bH4, bH5, bH11, bH12, bH15, bH17 y bH21.
- 3.—Las cepas números bH1, bH2, bH4, bH7, bH9, bH11, bH12, bH13, bH14, bH15, bH16, bH17, bH19, bH21, bKH1 y bKB2 no desarrollaron formas no ácidas alcohol resistentes.
- 4.—Las cepas números bH3, bH5, bH6, bH8, bH10, bH12, bH13 y bH?? desarrollaron numerosas formas no ácido alcohol resistentes.
- 5.—No todas las cepas presentaron el mismo grado de desarrollo en circunstancias iguales.
- 6.—Las resiembras en medio de Dubos en lapsos de 24, 48, 96 y 120 hs. reprodujeron a las bacterias con sus mismos caracteres salvo para las cepas bH10 que dieron origen al crecimiento de bacilos no ácido alcohol resistentes que no crecieron al ser subcultivados después de la 3a generación en este medio, tampoco desarrollaron en medio de la misma la bH17 que en los subcultivos dio formas coherentes sin volver a tomar sus caracteres anteriores.
- 7.—No se logró una sola cepa de bacilos no ácido alcohol resistentes después de las resiembras, salvo la bH10 antes anotada.
- 8.—Los gérmenes crecieron enturbiando el medio lo que no fue posible medir debido a que algunos de ellos desarrollan en formas de grumos por lo cual seguimos el criterio sumativo de Dubos marcando de X a XXXXXX el desarrollo y poniendo las letras "d" para desarrollo difuso y "g" para el granuloso, correspondiendo al microscopio "d" gérmenes aislados e individuales y "g" a haces de bacilos.
- 9.—Los bacilos de Koch, humano y bovino, usados como controles se comportaron exactamente como los describe Dubos.
- 10.—La cepa bH 16 fue inhibida en su crecimiento.

DISCUSION

En este trabajo no se emiten juicios acerca de la posible relación entre los gérmenes aislados y los de la lepra, sólo exponemos los siguientes comentarios:

- 1.—Todos son gérmenes aislados de material leproso.
- 2.—Sus características biológicas son muy distintas en las diferentes cepas.
- 3.—Aún faltan estudios para establecer plenamente la identidad de estos gérmenes.

Desde el punto de vista de la bacteriología moderna, cada vez más se tiene la tendencia a fabricar medios sintéticos en donde conocida la composición química pueden estudiarse matemáticamente los cambios metabólicos de los gérmenes y las necesidades mínimas para su crecimiento. No escapa a nadie la importancia de esta nueva vía en donde es posible encontrar algún día condiciones vitales bioquímicas que puedan permitir terapéuticas racionales.

Procediendo de manera semejante a Dubos obtuvimos con nuestras cepas resultados interesantes, ya que cepas con ciertas características semejantes actuaron de manera diferente frente al medio propuesto por este autor.

Nosotros sólo empleamos el Tween 80 (ésteres hidrosolubles del ácido oléico) debido a las enormes dificultades, casi insuperables, para obtener en el mercado Tween, pero nos parecía interesante hacer el estudio con otros Tween, ya que Dubos ha encontrado especialidad de necesidades de un Tween determinado en relación de una cepa específica de bacilo ácido alcohol resistente.

Insistimos en que estas 22 cepas fueron escogidas de otras muchas cuyas características parecen semejantes y sólo nos fueron dadas para su estudio las cepas diferentes entre sí como han sido descritas.

Ahora bien, si nosotros agrupamos a las cepas en relación de sus semejanzas biomorfológicas podríamos hacer los siguientes grupos:

- Grupo 1.—Cepas: bH1, bH9, bH13, bH16, bH19.
 Grupo 2.—Cepas: bH2, bH14.
 Grupo 3.—Cepa: bH3.
 Grupo 4.—Cepas: bH4, bH12.
 Grupo 5.—Cepas: bH5, bH7, bH8.
 Grupo 6.—Cepas: bH6, bH20, bH21.
 Grupo 7.—Cepa: bH10.
 Grupo 8.—Cepas: bH11, bH17, bH19.
 Grupo 9.—Cepa: bH15.
 Grupo 10.—Cepa: ???
 Grupo 11.—Cepas controles: bKH1 y bKH2.

Relacionando estos grupos con el comportamiento de los gérmenes frente al medio de Dubos, tenemos:

1 Grupo.—La cepa bH1 difiere de la bH9 en cuanto a la abundancia de crecimiento y se asemeja a la bH13; en cambio la bH16 es inhibida totalmente y la bH19 se parece a la bH9.

Analizando grupo por grupo vemos que existen diferencias fundamentales entre las cepas de un mismo grupo. Con el objeto de evitar errores imputables a manobras de técnica y a otros muchos factores repetimos tres veces el experimento obteniendo resultados en todos semejantes a los anotados en el cuadro IV, aun para dar mayor claridad fueron hechos subcultivos a los tiempos anotados en los cuadros tanto en medio de Dubos como en medio de Lowenstein. En el primero se reprodujeron matemáticamente los mismos fenómenos, existen sin embargo algunas anotaciones interesantes de los gérmenes de la cepa bH10 los cuales perdieron día a día su óndido alcohol resistencia, volviéndose muy granulosa al principio y posteriormente azules, crecieron bajo esta forma hasta la tercera generación por resembras en medio de Dubos, no pudiéndose subcultivar posteriormente, en medio de Lowenstein no fue posible recuperarlos a pesar de todos los esfuerzos hechos.

La cepa bH16 que no creció en Dubos se le pudo resembrar de este medio, creciendo y desarrollándose normalmente en medio de Lowenstein.

La cepa bH19 dió formas filamentosas óndido alcohol resistentes en medio de Lowenstein cuantas veces se le resembró del medio de Dubos.

La cepa bH21 dió en las resembras formas filamentosas no

óndido alcohol resistentes.

La cepa 777 coloreó los tubos del medio de Dubos de ligero color salmón al cabo de 15 días.

En la obra de Shira y Shouz 1944, en el capítulo de Lepra se dice que los gérmenes que han sido cultivados, partiendo de lesiones activas de lepra se pueden dividir en 5 grupos:

- 1.—Difteroides y a veces sólo parcialmente óndido resistentes (tipo Babes-Kedrowaký)
- 2.—Microorganismos óndido resistentes que producen colonias amarillentas (tipo Cleg)
- 3.—Anamohias óndido resistentes (tipo Ducrey, Campaña y Germá)
- 4.—Bacilos óndido resistentes que no producen colonias coloradas (Duke y Liston)
- 5.—Streptotrix Filamentosas óndido resistentes (Deyck y Liston)

En los últimos años las relaciones de estos cultivos, con el verdadero germen de la lepra, se han puesto en duda.

Con estas anotaciones nos parece de sumo interés inquirir la posibilidad de emplear el método de Dubos como un procedimiento diferencial de los bacilos óndido alcohol resistentes. Creemos con ésto haber contribuido con un estudio interesante y novedoso a demostrar con un medio sintético ciertas características histológicas diferenciales del grupo de los bacilos óndido alcohol resistentes y nos parecen estos estudios suficientemente importantes como para hacer una revisión de la bacteriología de los gérmenes de este tipo, desde este punto de vista.

RESUMEN

1.—Se hace una breve reseña de las características biológicas de 22 cepas de bacilos ácido alcohol resistentes, obtenidos a partir de material leproso.

2.—Se describen los caracteres diferenciales y comunes de esos gérmenes.

3.—Se anotan los resultados obtenidos en medio de Dubos con Tween 80.

4.—Se establece una discusión dando importancia a este nuevo método para diferenciar bacilos ácido alcohol resistentes.

RESUME

1.—On fait courte exposition sur les caractéristiques biologiques de 22 souches isolées de matériel lépreux.

2.—Les caractéristiques différentielles et communes des microbes sont exposées.

3.—Les souches ont été cultivées sur le milieu de Dubos et les résultats notés.

4.—On établit une discussion sur l'importance qui peut avoir cette nouvelle méthode pour différencier les bacilles acido alcool résistants.

SUMMARY

1.—A brief compilation of the biological characteristics of 23 strains of acido alcohol resistant bacillus obtained from leprosy material is made.

2.—Differential and common characteristics are exposed.

3.—Cultivation answers of these strains in Dubos's media are noted.

4.—A discussion is made in order to demonstrate the importance of this new method in rapport with bacteriological differentiation of different acid alcohol resistant bacillus strains.

BIBLIOGRAFIA

- 1.—Mansier, M. A.: Comunicación personal. México, D. F. 1948
- 2.—Dubos, R. I. Rapid and submerged growth of mycobacteria in liquid media.—*Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.* 58, 361, 1945
- 3.—Dubos, R. I. and Davis, B. D. Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media.—*The Jour. of Exp. Med.* 83, 429, 1945
- 4.—Dubos, R. I. and Davis, B. D. The effect of water soluble lipids on the growth and biological properties of tubercle bacilli. *The American Review of Tuberculosis*, Sept. 1945, Vol. LIV, page 224
- 5.—Zehl, Neelsen citado en Kolmer, I. A. and Boerner, F. Approved laboratory Technic. Ediciones D. Appleton Century Company, Incorporated, New York, London, Fourth Edition, 178, 1941
- 6.—Gram-Bacillo citado en Kolmer, I. A. and Boerner, F. Approved laboratory Technic, Ediciones D. Appleton Century Company, Incorporated, New York, London, Fourth Edition, 376, 1945
- 7.—Wodsworth, D. L. Standard Methods of the Division of Laboratories and Research.—Ediciones W. B. Saunders & Williams Company, Baltimore, Second Edition, Chapter VIII, 19
- 8.—Topley, W. W. C. and Wilson, G. S. The Principles of bacteriology and immunity. Ediciones The Williams & Wilkins Company, Baltimore, Second Edition, Chapter VIII, 1936
- 9.—Davis, B. D. and Dubos, R. I. Binding of Fatty acids by serum albumin a protective growth factor in biological media. *The Jour. of Exp. Med.* 9, 215, 1947