

Sobre algunas características de las micobacterias patógenas para el hombre y animales domésticos

Alexis Ilukevich Anerik *

... de todas maneras, el que viene detrás de mí ten-
drá un ladrillo más en sus manos para edificar una
obra mejor ...

INDICE

	Pág.
PROLOGO	4
CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS	5
Según Bergey's Manual of Determinative Bact.....	5
Según Ilukevich y colaboradores	7

Trabajo presentado al Honorable Consejo de Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, como Credencial de mérito para ascender a la Categoría de Profesor Titular, de acuerdo a lo establecido en el Reglamento de Personal Docente y de Investigación de la Universidad del Zulia.

- * /Médico Veterinario, Univ. Nacional de Latvia (1940).
Doctor medicinae veterinariae, Univ. Riga (1943).
Doctor habilitatibus, U.N.R.A. Univ., Munich Alemania (1946).
Doctor en Medicina Veterinaria, Univ. Central de Venezuela (1959).

	Pág.
GUÍA PARA LA DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM	12
MICOBACTERIAS NO CLASIFICADAS O ANONIMAS	14
PROPIEDADES TINTOREAS DE LAS MICOBACTERIAS	17
Coloración acidorresistente según Ehrlich	17
Técnica de Ziehl y Neelsen	18
Técnica de Quandt	20
Factores que determinan la acidorresistencia	22
Coloración "en frío" según Aubert	25
Coloración de los gránulos de Much	27
Influencia tintórea de la composición química de diferentes fuc- sinas	30
Coloración fluorescente	32
Técnica de Steffen (frotis)	32
Técnica de McClure (cortes)	34
Características tintóreas del <i>M. leprae</i>	35
Técnica de Fite y colaboradores	35
Técnica de Gram "en caliente"	37
ESTRUCTURA MICROSCOPICA, ULTRAMICROSCOPICA Y FUNCIONAL DE LAS MICOBACTERIAS	38
Gránulos citoplasmáticos	38
Concepto de la fase filtrable según Fontes	42
Sistema nuclear	45
Membrana citoplasmática	45
Ribosoma	47
Pared celular	48
Conjugación	48
Vacuolización electrónica bacilar	49
Bacilos en degeneración (<i>M. leprae</i>)	49
PARTICULARIDADES BIOQUIMICAS DE LAS MICOBAC- TERIAS	54
Vitaminas	54
Reacción de Konno (niacina)	55
Técnica de Runyon (niacina)	56
Técnica de Centro Panamericano de Zoonosis (niacina)	57
Enzimas, coenzimas y iones metálicos	57
Catalasa y su determinación	58
Actividad catalásica y resistencia a la hidrazida del ácido isoni- cotínico	58
Peroxidasa	59

	Pág.
Asimilación de carbohidratos	59
Penicilinas	59
Amidasas	60
Prueba del desdoblamiento enzimático de las amidasas según Bönicke	60
Nitro-reductasa	62
Esquema de Verhoeven de la reducción de nitratos	64
Determinación de amoníaco bacteriano según Ilukevich y Mora	65
Reducción de telurito	67
Reducción de azul de metileno	67
Bacteriostáticos tipo-específicos	68
DEMOSTRACION DE LA VIRULENCIA "IN VITRO"	70
Acordonamiento bacilar	70
Fijación de rojo neutro	71
PARTICULARIDADES DEL CULTIVO DE LAS MICOBACTERIAS	
Cultivo en medios hísticos	72
Cultivo en la cámara anterior del ojo	73
Cultivo en el embrión de pollo	73
Cultivo en los macrófagos	74
Cultivo en la cavidad abdominal del ratón	74
Cultivo en la planta podal del ratón	75
Cultivo en medios inanimados	75
Cultivo en el medio a base de huevo	76
Efecto de piruvato de sodio	76
Efecto de la glicerina	77
Efecto de los lípidos complejos	78
Efecto del ácido oleico	78
Efecto de la sero-albúmina	78
Efecto del Tween - 80	78
Efecto de la sangre envejecida	79
Métodos de descontaminación y homogeneización	79
Cultivo de <i>Mycobacterium paratuberculosis</i>	80
Intentos de obtener el cultivo de <i>Mycobacterium leprae</i>	81
Intentos de obtener el cultivo de <i>Mycobacterium lepraemurium</i>	84
Características de diferentes cultivos	85
CARACTERISTICAS SEROLOGICAS DE LAS MICOBACTERIAS	
Diferenciación antigénica de los bacilos tuberculosos	91
Reacción de aglutinación-caolín	91
Sero-aglutinación de las micobacterias	92

	Pág.
Serotipos micobacterianos	93
Armadillo como animal de experimentación leproológica	93
Seroaglutinación de Bacilos "anónimos" aislados de leprosos	94
SUMARIO	95
SUMMARY	97
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	100

PROLOGO

Las enfermedades producidas por micobacterias en el hombre y animales representan un importante y específico renglón en la nosología de las enfermedades infecciosas.

El avance de los diferentes métodos de diagnóstico bacteriológico, como también los adelantos logrados últimamente en los procedimientos de control de dichas enfermedades, nos obligaron a condensar una gran cantidad de literatura del ramo, y, junto con propias experiencias, sintetizar el texto expuesto a continuación.

En cuanto a los agentes infecciosos de las enfermedades en cuestión, éstos se asemejan mucho entre sí a nivel de sus características tinteas y aspecto morfológico, pero se difieren en mayor o menor grado por sus particularidades de cultivo, propiedades metabólicas, serológicas (antigénicas) y biológicas.

El estudio anatomo-patológico, tanto macroscópico como microscópico no siempre nos lleva a un diagnóstico acertado, ya que la respuesta tisular en diferentes enfermedades micobacterianas puede ser característica pero no específica para un agente determinado.

Aunque las enfermedades como la tuberculosis del hombre y de los animales, la paratuberculosis bovina y ovina, la enfermedad de Hansen, la lepra del búfalo, de la rata y de la rana y, algunas otras micobacteriosis son producidas por agentes pa-

tógenos y virulentos, existe un gran número de micobacterias inofensivas que están muy difundidas en la naturaleza.

Las micobacterias no patógenas desarrollan funciones biológicas muy importantes en el suelo y pueden transformar los hidrocarburos en sustancias orgánicas asimilables por los vegetales.

Algunas micobacterias son capaces de atacar y descomponer los hidrocarburos de la gasolina, un hecho que puede crear accidentes en la industria del petróleo.

Se sabe que la virulencia y patogenicidad de las micobacterias son particularidades inconstantes y variables y que, casi toda la acción de su complejo metabolismo está caracterizada por frecuentes cambios y ajustes a las condiciones del medio exterior. Es ésta, pues, la razón por la cual una gran parte de investigadores sostienen la opinión que no existen especies invariables, otros, sin embargo, siguen insistiendo en la invariabilidad de las mismas.

Durante unos treinta años nos hemos dedicado al estudio de las características citológicas y efectos patógenos de las micobacterias, con aspiración de contribuir al mejor conocimiento de las enfermedades que éstas producen. Nuestra intención ha sido, no solamente de exponer al lector lo resuelto y aceptado unánimamente, sino también, enterarlo en lo que aún está por dilucidar.

Finalmente, creemos que es oportuno señalar que el Comité de Expertos de la Organización Mundial de la Salud, en tuberculosis, en su noveno informe (1974) llegó a la conclusión que **"conviene seguir estudiando los métodos simplificados para la identificación de las micobacterias"**.

Alexis ILUKEVICH.

CLASIFICACION DE LAS MICOBACTERIAS

Según Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957) las micobacterias pertenecen al:

REINO: Vegetal (Cohn, 1872*)

TIPO (Phylum): Talófitas (**Thallophyta**-Endlicher, 1836)

CLASE: Esquizomicetos (**Schizomycetes** - Naegeli, 1857)

ORDEN: Actinomicetales (**Actinomycetales**-Buchanan, 1917).

FAMILIA: Micobacteriáceas (**Mycobacteriaceae**- Chester, 1901).

GENERO: *Mycobacterium* (***Mycobacterium*** - Lehmann y Neumann, 1896).

(*) La inclusión de los microorganismos en el reino vegetal es aceptada solamente con el propósito de facilitar su clasificación; en realidad no son ellos verdaderos vegetales, tampoco animales.

La familia de las Micobacteriáceas abarca microorganismos que no poseen micelios o que los tienen rudimentarios, y que no forman esporos; se dividen en dos géneros:

1° *Mycobacterium* (***Mycobacterium*** - Lehmann y Neumann, 1896).

2° *Micococcus* (***Mycococcus*** - Krassilnikov, 1938).

Al género ***Mycobacterium*** pertenecen bacterias inmóviles que no producen esporos, que son ácido-resistentes y aerobias. El género ***Mycobacterium*** es constituido de 14 especies clasificadas, que según Bergey's Manual of Determinative Bacteriology son las siguientes:

I. **Saprófitos incluso parásitos ocasionales (potential parasites):**

1 ° *Mycobacterium phlei*, Lehmann y Neumann, 1899

2 ° *Mycobacterium smegmatis*, Lehmann y Neumann, 1899

3 ° *Mycobacterium fortuitum*, Cruz, 1938

4 ° *Mycobacterium marinum*, Aronson, 1926

5 ° *Mycobacterium thamnopheos*, Aronson, 1929

6 ° *Mycobacterium platypoecilus*, Baker y Hagan, 1942

II. **Parásitos de los animales homotermos:**

7 ° *Mycobacterium ulcerans*, MacCallum, 1950

- 8 ° *Mycobacterium tuberculosis*, Lehmann y Neumann, 1896
 9 ° *Mycobacterium bovis*, Bergey y colaboradores, 1934
 10 *Mycobacterium microti*, Reed o *Mycobacterium muris*,
 Smith y colaboradores, 1948,
 11 *Mycobacterium avium*, Chester, 1901
 12 *Mycobacterium paratuberculosis*, Bergey y colabora-
 dores, 1923.
 13 *Mycobacterium leprae*, Lehmann y Neumann, 1896
 14 *Mycobacterium lepraemurium*, Marchoux y Sorel,
 1912.

Según Salle (1957) la descripción para la familia *Mycobacteriaceae* es la misma que para el género *Mycobacterium* y es la siguiente:

“Filamentos delgados, bacilos rectos o ligeramente curvos, a menudo de forma irregular, y ligeramente ramificados a veces. Con frecuencia se tiñen de modo desigual, es decir, muestran diferencias de reacción a los colorantes dentro de la célula (burbujas). Inmóviles, sin conidios, aerobios, grampositivos, ácido-resistentes. Las especies patógenas tardan en desarrollarse (varias semanas); las del suelo, el agua y la vegetación crecen con más rapidez (en varios días)”.

Ilukevich y col. (1964) clasifican las micobacterias partiendo de los efectos patógenos que éstas producen en animales susceptibles, agrupándolas en tres categorías siguientes:

I. Especies patógenas para el hombre y animales homotermos:

- 1° *Mycobacterium tuberculosis*, Lehmann y Neumann, 1896,
 (Koch, 1882).
Bacterium tuberculosis, Zopf, 1883
Mycobacterium tuberculosis VAR. *hominis*, Bergey y
 colaboradores, 1934.
Mycobacterium tuberculosis typus humanus, Lehmann,
 y Neumann, 1907.
Tuberkelbacillus, Koch, 1882
Bacilo de Koch (nombre común)
 El microorganismo es el agente infeccioso de la tuber-
 culosis humana, principalmente.

- 2° **Mycobacterium bovis**, Bergey y colaboradores, 1934, (Smith, 1896).
Mycobacterium tuberculosis var. bovis, Bergey y colaboradores, 1934.
Mycobacterium tuberculosis typus bovinus, Lehmann y Neumann, 1907.
Bacilo tuberculoso bovino (nombre común).
Produce la tuberculosis en casi todas las especies de animales mamíferos, en los bovinos, principalmente.
- 3° **Mycobacterium muris**, Smith y colaboradores, 1948, (Wells, 1937).
Mycobacterium microti, Reed, 1956
Mycobacterium tuberculosis var. muris, Brooke, 1941
Vole bacillus, Wells, 1937.
Bacilo de Wells (nombre común)
Produce lesiones tuberculosas generalizadas en el arvicola (**Microtus agrestis**), ratón de bosque (**Apodemus Sylvaticus**) y en el musgano (**Sorex araneus**), principalmente.
- 4° **Mycobacterium avium**, Chester, 1901 (Strauss y Gamaléia, 1891).
Mycobacterium tuberculosis avium, Lehmann y Neumann, 1896.
Mycobacterium tuberculosis typus gallinaceus, Lehmann y Neumann, 1907.
Bacillus der Huhnertuberculose, Maffucci, 1892
Bacilo tuberculoso aviar (nombre común).
El bacilo mencionado es el agente infeccioso de la tuberculosis de las gallinas y especies afines, también de los bovinos y porcinos, parcialmente.
- 5° **Mycobacterium balnei**, Norden y Linell, 1951
Germen considerado responsable de lesiones cutáneas en los humanos (infección balnearia); es idéntico con el **Mycobact. marinum**, Aronson - 1926.
- 6° **Mycobacterium ulcerans**, McCallum y colaboradores, 1948, 1950.
Es el agente infeccioso de lesiones ulceradas crónicas en la piel, subcutis, músculos, tendones y huesos de los humanos.

7° **Mycobacterium paratuberculosis**, Bergey y colaboradores, 1923.

Mycobacterium enteritidis, Lehmann y Neumann, 1927

Bacilo de Johne (nombre común)

Responsable de la disentería del ganado vacuno y ovino; enfermedad descrita por Johne y Frothingham, en 1895; bacilo cultivado por Twort, en 1910.

8° **Mycobacterium leprae**, Lehmann y Neumann, 1896 (Hansen, 1874).

Bacillus leprae, Armauer Hansen, 1874

Bacilo de Hansen (nombre común)

Bacilo considerado como causa etiológica de la enfermedad de Hansen o lepra de los humanos.

9° **Mycobacterium lepraemurium**, Marchoux y Sorel, 1912 (Stefansky, 1903).

Bacilo de Stefansky (nombre común)

Es el agente infeccioso de la lepra de las ratas.

10 **Mycobacterium bubalorum**, Lobel, 1934 (Kok y Roesli, 1926).

El bacilo está relacionado con la formación de nódulos lepromatosos en los búfalos de agua de Java.

11 **Mycobacterium fortuitum**, Cruz, 1938

Produce abscesos en el hombre, lesiones supurativas en los bovinos y nódulos generalizados en ranas; es idéntico con el *M. giae*, Darzins, 1950.

II. Especies parásitas y patógenas para los animales de sangre fría:

1° **Mycobacterium piscium**, Bergey y colaboradores, 1934.

Bacillus tuberculosis piscium, Dubard, 1897

Microorganismo aislado de nódulos tuberculoides de carpas; es patógeno para ranas, sapos, tortugas, serpientes, lagartos y salamandras. En la infección artificial no produce lesiones en conejos, acures y pollos. No causa enfermedad en peces de agua salada.

- 2° **Mycobacterium friedmanii**, Holland, 1934
Mycobacterium chelonae, Bergey y colaboradores, 1934
Mycobacterium ranae, Kuster, 1905
- Bacilo aislado por Friedman, en 1903, de nódulos caseosos pulmonares de una tortuga. Experimentalmente produce lesiones granulomatosas localizadas, casi en todas las especies de animales de sangre fría, ocasionalmente, también en el acure; es inofensivo para conejos, ratas y ratones. Actualmente lo consideran idéntico con el **Mycobacterium smegmatis** (Ruth Gordon, 1953, en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957).
- 3° **Mycobacterium marinum**, Aronson, 1926
- Microorganismo aislado de focos necróticos viscerales de peces de agua salada (**Abudefduf mauritii**, **Micropogon undulatus** y **Centro pristis striatus**). Es patógeno para ranas y también para ratones y palomas. No causa lesiones en conejos y acures; se cree que es idéntico con el **Mycobacterium balnei**, Norden y Linell, 1951.
- 4° **Mycobacterium thamnopheos**, Aronson, 1929.
- Produce lesiones granulomatosas generalizadas en la serpiente **Thamnophis sirtalis**; experimentalmente causa lesiones en serpientes, ranas, lagartos y peces; no es patógeno para conejos, acures y pollos.
- 5° **Mycobacterium platypoecilus**, Baker y Hagan, 1942
- Aislado de úlceras cutáneas y lesiones viscerales de pez mexicano, **Platypoecilus maculatus**.
- 6° **Mycobacterium giae**, Darzins, 1952
- Bacilo cultivado a partir de focos (nódulos) viscerales de ranas de Bahía, Brasil. Experimentalmente produce tubérculos en acures; según Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1957), es idéntico con el **Mycobacterium fortuitum**, Cruz, 1938.
- 7° **Mycobacterium sp.**, Machicao y La Placa, 1954
- Agente infeccioso de lesiones granulomatosas, semejantes a lepromas, en la piel y vísceras de ranas de La Paz, Bolivia.

III. Especies saprófitas:

1° **Mycobacterium phlei**, Lehmann y Neumann, 1899

Microorganismo aislado por Moeller, en 1898, del fleo (**Phleum pratense**) - una gramínea forrajera; es muy difundido en la hierba, heno, suelo y polvo. No es patógeno para animales de experimentación, no obstante, inoculado en dosis masivas puede causar en el acure pequeños abscesos reversibles.

Sinonimia: **Mycobacterium moelleri**, Chester, 1901

Sclerotrix phlei, Vuillemin (?)

Thimothebacillus o **Grassbacillus**, Moeller, 1898

2° **Mycobacterium smegmatis**, (Trevisan, 1889) Lehmann y Neumann 1899.

Smegma bacillus, Alvarez y Tavel, 1885

El microorganismo es muy extendido en la naturaleza; se encuentra en la leche y productos lácteos contaminados, en el estiércol bovino y heces de roedores; con frecuencia hallado en el esmegma de los humanos y animales. Es descrito bajo otros nombres específicos, tales como:

Mycobacterium lacticola, Lehmann y Neumann, 1899.

Mycobacterium berolinensis, Bergey y colaboradores, 1934 (aislado por Rabinowitsch, en 1897).

Mycobacterium butyricum, Bergey y Colaboradores, 1934.

Butterbacillus, Petri, 1898

Mycobacterium graminis, Chester, 1901

Mycobacterium lacticola alfa planum, Lehmann y Neumann, 1896.

Mycobacterium lacticola planum, Haag, 1897

Mycobacterium stercoris, Bergey y colaboradores, 1934.

Mistbacillus, Moeller, 1898

Bacillus friburgensis, Korn, 1899

GUIA PARA LA DIFERENCIACION DE LAS ESPECIES DEL GENERO MYCOBACTERIUM

Reed, G., Gordon, R., y Hanks, J. H. (en Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Williams and Wilkins Co., Baltimore, 7° Ed., 1957, Reed. 1966, pág. 695) recomiendan la siguiente clave para las especies del género en cuestión:

I. **Saprófitos incluso parásitos ocasionales** (potential parasites); se desarrollan rápidamente en la mayoría de los medios de cultivo a la temperatura de 28°C.

Tanto las cepas cultivadas a partir de lesiones tuberculosas de los animales de sangre fría, como las procedentes de úlceras, lesiones cutáneas y otras infecciones de carácter ocasional en animales mamíferos, no se distinguen de los saprófitos aislados del suelo, agua, plantas y otros substratos.

Dichas micobacterias son acidorresistentes cuando se desarrollan bajo condiciones apropiadas.

A. especies que crecen a la temperatura de 45°C:

1. Crecen a 52°C.; no producen ácido de ramnosa o inositol:

(1) *Mycobacterium phlei*

2. No crecen a 52°C.; producen ácido de ramnosa o inositol:

(2) *Mycobacterium smegmatis*

B. No se desarrollan a la temperatura de 45°C.:

(3) *Mycobacterium fortuitum*

(4) *Mycobacterium marinum*

(5) *Mycobacterium thamnophaeos*

(6) *Mycobacterium platypocilus*

II. **Parásitos de animales homotermos**; bacilos ácido resistentes:

A. Se desarrollan en medios de cultivo artificiales,

1. No crecen a las temperaturas superiores de 33°C; no son patógenas para acures y conejos, sin embargo, producen lesiones cutáneas en ratas y ratones inoculados experimentalmente. Dichas micobacterias producen lesiones ulceradas crónicas en los humanos:

(7) Mycobacterium ulcerans

2. Crecen a la temperatura de 37°C:
 - a) Crecimiento lento en todos los medios de cultivo
 - b) Produce tuberculosis generalizada experimental en el acure.
 - c) No produce tuberculosis generalizada experimental en el conejo y pollo. Colonias típicas son ligeramente pigmentadas y glicerínófilas:

(8) Mycobacterium tuberculosis

- cc) Produce tuberculosis generalizada experimental en el conejo y acure; no la produce en los pollos. Colonias típicas no producen pigmento alguno y son glicerínóforas:

(9) Mycobacterium bovis

- bb) No producen tuberculosis generalizada experimental en acures.
- c) Produce tuberculosis generalizada experimental en el ratón silvestre, no la produce en los pollos:

(10) Mycobacterium microti

- cc) Produce tuberculosis generalizada experimental en diferentes aves, gallinas especialmente:

(11) Mycobacterium avium

- aa) Crece en cultivos primarios con adición de micobacterias muertas por el calor, o de sus extractos, al medio de cultivo; no es patógeno para los acures y pollos:

(12) Mycobacterium paratuberculosis

- B. No se desarrollan en medios de cultivo inanimados
 1. La enfermedad ocurre en personas. El agente infeccioso no se transmite a otras especies animales.

(13) *Mycobacterium leprae*

2. La enfermedad ocurre en ratas salvajes y ratones. La transmisión artificial a las ratas, ratones y hamsters es posible.

(14) *Mycobacterium lepraemurium*

En las últimas décadas, sin embargo, se han encontrado micobacterias que no se identifican con ninguna de las especies mencionadas y que se han designado como micobacterias "atípicas", "anónimas" o "no clasificadas" (Beaven, y col., 1931; Feldman y col., 1934; Pinner, 1935; Pollak y Buhler, 1955; Runyon, 1959; Pollak y Quiñones, 1962).

Varios autores hablan de un considerable número de pacientes con pulmones afectados en los cuales un cuidadoso estudio de cultivos de esputo nunca ha revelado bacilos tuberculosos, a pesar de un repetido hallazgo de micobacterias "atípicas" (Wood y col., 1956; Weed y col., 1957; Levis y col., 1959; Meissner, 1960).

También de las lesiones leprosas de la piel humana se han aislado micobacterias no clasificadas que en experimentos de inoculación han producido lesiones características de tipo lepromatoso en diferentes animales de laboratorio (Soule y McKinley, 1932; Souza Araujo, 1950; Convit y col., 1962; Binford, 1962; Ilukevich, 1969).

Los datos proporcionados por Wedman (1966) revelan que en Estados Unidos, país donde las pérdidas debidas a la tuberculosis bovina se hallan en un nivel extremadamente bajo, en 1963, lograron aislar 151 cepas procedentes de bovinos positivos a la prueba de tuberculina, con los siguientes resultados:

<i>M. bovis</i>	65 cepas
<i>M. Avium</i>	15 cepas
Micobacterias no clasificadas.....	71 cepas

Timple y Runyon (1954), y posteriormente Runyon (1959) idearon un método provisional para reunir todas las micobacterias "atípicas" en los 4 grupos siguientes:

Grupo I: Micobacterias fotocromógenas

La pigmentación de las colonias que se desarrollan en obscuridad es nula o muy escasa; al exponer durante 1 hora colonias recién desarrolladas a la luz del día o de un foco de 30 vatios colocado a 45 cm., éstas colocadas de nuevo en la incubadora (a obscuridad), a las 6 a 12 horas se tornan amarillas. En las colonias maduras la reacción provocada por la luz es lenta o nula. La velocidad del crecimiento es como la del bacilo tuberculoso, o algo más rápida, a 37°C; sin embargo, crecen también a 25°C. Las colonias por lo general son de aspecto liso, con cierta tendencia a rugosidad. Las células son de tamaño medio un poco mayor que los bacilos de la tuberculosis y fuertemente ácido resistentes.

En medios líquidos suelen revelar cierta tendencia a la formación de cordones (acordonamiento). Los gérmenes acusan una moderada (a veces intensa) actividad catalásica y no producen niacina en cantidades apreciables. Su resistencia a las drogas antituberculosas "in vitro" es apreciable. Los bacilos inoculados por vía intravenosa o intraperitoneal son capaces de producir enfermedad evolutiva en ratones y cricetos (hamster).

No producen lesiones progresivas en el acure por inyección subcutánea, son apatógenos para el conejo y pollo.

En la actualidad se conocen 2 serotipos diferentes de las micobacterias fotocromógenas.

Grupo II: Micobacterias escotocromógenas

Las colonias aparecen pigmentadas (de color amarillo hasta anaranjado rojizo) tanto en la obscuridad como en presencia de la luz. La velocidad de crecimiento se aproxima a la del bacilo tuberculoso humano, a los 37°C. Se desarrollan también a la temperatura de unos 25°C., pero mucho más lento; el crecimiento suele cesar a los 45°C. Las colonias son casi siempre de aspecto liso, raramente rugosas y a veces en forma de una película

cromógena. Las células son fuertemente ácido resistentes, no forman cordones, poseen moderada (a veces intensa) actividad catalásica y no producen niacina en cantidades apreciables por la reacción de Konno. La resistencia a los fármacos es como la del Grupo I.

No producen lesiones en el acure, conejo y pollo, no obstante, existen cepas patógenas para ratones, ratas y cricetos.

Hay 3 serotipos reconocidos.

Grupo III: Micobacterias no-fotocromógenas:

La mayoría de las cepas no son cromógenas, y cuando hay una leve pigmentación, ésta se desarrolla lentamente. Pertenecen a este grupo cepas que revelan cierta semejanza con *M. avium*, y que en la mayoría de los casos se desarrollan a los 45°C. y reducen el telurito de potasio.

Las colonias generalmente son de aspecto liso, húmedo, redondas, convexas y relativamente pequeñas. Las células son pleomorfas, a menudo sumamente cortas y marcadamente ácido resistentes. No forman cordones. La actividad de catalasa en general es moderada, a veces poca, o intensa (excepcionalmente). No forman niacina en cantidades apreciables por la reacción de Konno. La resistencia a los fármacos es como la del grupo I, pero mayor a la isoniacida y menor a la estreptomycinina.

La patogenicidad para los animales de laboratorio no es uniforme; algunas cepas pueden causar lesiones progresivas en ratones (en ratones negros híbridos, especialmente), cricetos y pollos; otras son apatógenas.

Se conocen 17 serotipos diferentes.

Grupo IV: Micobacterias de crecimiento rápido

Las colonias en los cultivos primarios aparecen después de unos pocos días de incubación a los 37°C (20°C a 45°C y más); son generalmente eugónicas de aspecto liso o rugoso, cromógenas o no cromógenas. Muestran en general intensa actividad de

catalasa y reducen el telurito de potasio. Las células acusan marcada resistencia a las drogas tuberculostáticas y no producen niacina en cantidades apreciables, salvo algunas cepas de *Mycobacterium fortuitum* y de *Mycobacterium borstelense* que son capaces de sintetizar la vitamina mencionada (Bonicke y Ewoldt, 1965). Con excepción de las dos especies mencionadas son inocuas para el hombre y animales.

Ultimamente se han registrado 2 serotipos diferentes.

En lo que se refiere a la clasificación de las micobacterias en general, los métodos usados actualmente son numerosos, sin embargo, casi ninguno por separado puede resolver el problema por completo, y solamente la aplicación de varios procedimientos en conjunto puede ofrecer datos de mayor alcance taxonómico.

PROPIEDADES TINTOREAS DE LAS MICOBACTERIAS

Paul Ehrlich (1882) dio a conocer un método de coloración de los bacilos tuberculosos basado en acidorresistencia de los mismos. Ehrlich mezcló una solución saturada de aceite de anilina en agua con solución alcohólica de violeta de metilo (mezcla de fucsinas más o menos metiladas) y tiñó frotis con este líquido. Luego trató las frotis coloreadas con solución de ácido nítrico al 10 por 100 y finalmente empleó el pardo de Bismarck (vesuvina o triamidoazobenceno) como colorante de contraste. Los bacilos acidorresistentes aparecían de color púrpura y los no acidorresistentes de pardo, al igual que el resto de la preparación. Con la técnica mencionada se quedó demostrado que los bacilos en cuestión una vez teñidos retienen el colorante en forma permanente y pueden resistir el lavado con ácido mineral diluido.

Casi en el mismo tiempo, Ziehl (1882) describió un método muy semejante al mencionado, en el cual el mordiente representado por el aceite de anilina había sido sustituido por el fenol (ácido fénico), modificación que mejoraba notablemente la estabilidad de la coloración. Un poco más tarde, Neelsen (1883) introduce el uso de fucsina en vez de violeta de metilo (que en realidad es una mezcla de fucsinas metiladas) y emplea el ácido sulfúrico en lugar de nítrico, demostrando a la vez que la coloración se facilita notablemente haciendo actuar la fucsina en caliente.

Una combinación de los procedimientos referidos constituye lo que hoy se conoce por la coloración de Ziehl-Neelsen, un método que por cierto podría llevar también el nombre de Ehrlich, porque en lo esencial es el mismo que fue descubierto y recomendado por este investigador.

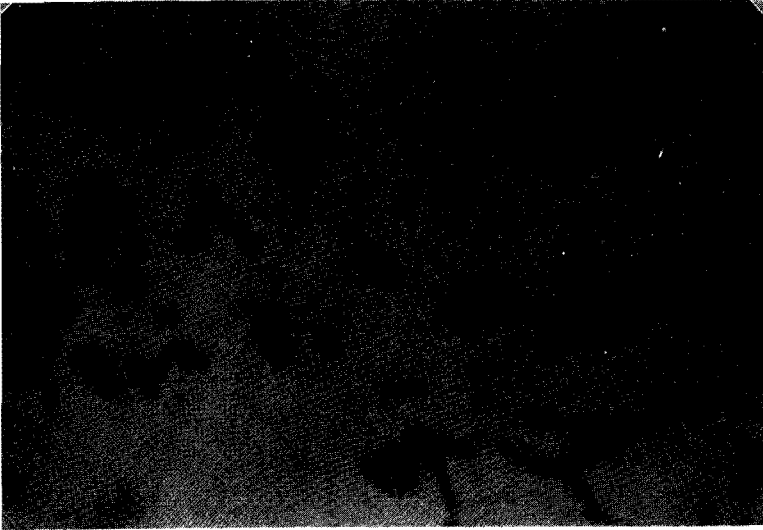
Figura 1



Aspecto microscópico de *Mycobacterium bovis* en el frotis por aposición de un bazo de acure infectado artificialmente. Coloración acidorresistente con la técnica de Ehrlich: Los bacilos tuberculosos aparecen de color púrpura y el resto de la preparación de pardo. Objetivo de inmersión. 400 aumentos.

En la actualidad existe un número bastante elevado de modificaciones del método clásico de coloración acidorresistente, sin embargo, ninguno de ellos ha podido reemplazar el procedimiento original. Pla y Armengol (1954) afirma "que el procedimiento que aun hoy se usa más es el clásico llamado de Ehrlich-Ziehl (es notorio que el autor mencionado omite el nombre de Neelsen) que, por los trabajos de comprobación que se han

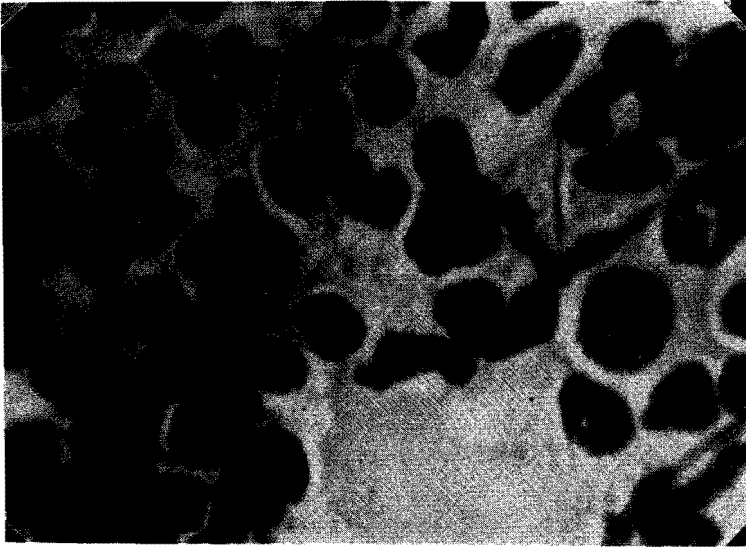
Figura 2



Aspecto microscópico de *Mycobacterium tuberculosis* en el medio de cultivo líquido de Sula. Coloración ácido resistente según la técnica de Ilukevich (ver Pág. 28) con los colorantes de Ziehl y Giemsa; los bacilos tuberculosos aparecen de color rojo y los gránulos citoplasmáticos de azul tinto. Objetivo de inmersión. 1200 aumentos.

hecho, puede afirmarse que es el que en la mayoría de los casos ofrece más garantías, y el que debe recomendarse como habitual." Sin embargo, entre las modificaciones del método se destacan algunas por su valor práctico comprobado. No cabe duda que el empleo de ciertos colorantes azules del grupo de colorantes básicos oxazínicos que se forman por la acción de una nitrosoamina sobre una naftilamina (azul de Nilo, azul de noche), intensifica la coloración, ya que parece que dichos colorantes tienen una acción selectiva sobre el protoplasma bacilar. La introducción de crisoidina (colorante pardorrojizo: $C_{12} H_{12} N_4$. ClH) como colorante de contraste, mejora notablemente los resultados de la coloración. Nuestras experiencias con dichos colorantes

Figura 3



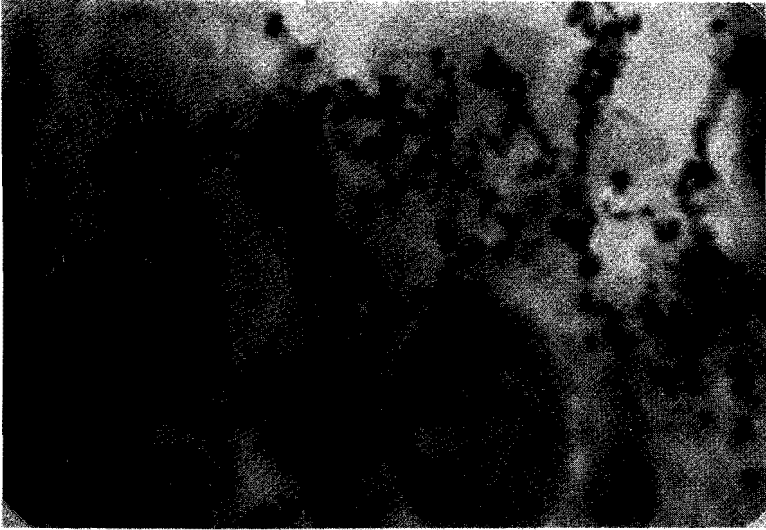
Aspecto microscópico de *Mycobacterium bovis* en el frotis por aposición de un bazo de acure infectado artificialmente. Coloración ácidorresistente según Ziehl-Neelsen: los bacilos tuberculosos aparecen de color rojo y el resto de la preparación de azul. Objetivo de inmersión, 512 aumentos.

demonstraron una vez más el destacado valor de la técnica de Quandt (ver Fig. No 7) según la cual las micobacterias aparecen de color azul tinto y el resto de la preparación de amarillo. He aquí el método de Quandt:

Reactivos: 1º- Azul de noche (Nachtblau-Merck) 5 grs.

Alcohol etílico al 96%	100 c. c.
2º- Fenol líquido (1: 1)	2,5 c.c.
Solución de KOH al 10%	0,2 cc.
Agua destilada	100 c.c.
3º- Crisoidina (Chrysoidin-Merck) . .	2 grs.
Agua destilada	300 c.c.

Figura 4

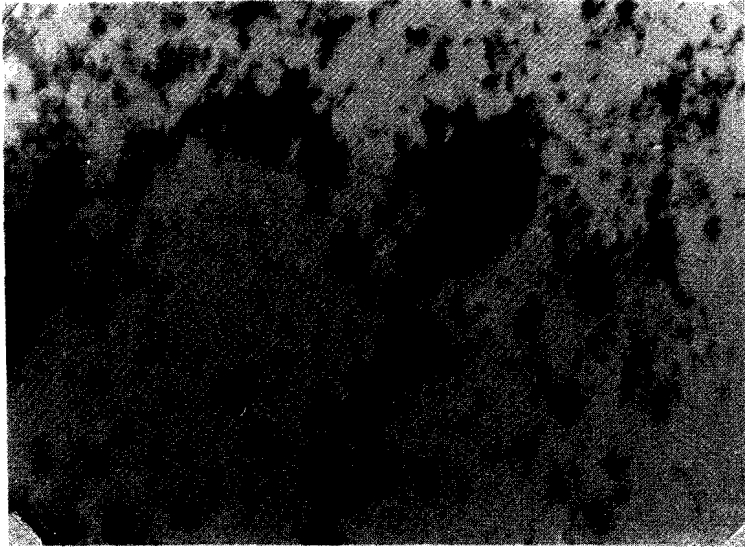


Aspecto microscópico de *Mycobacterium avium* en el frotis por aposición de un hígado de gallina infectada artificialmente. Coloración ácido-resistente con la fucsina de Zhiel; colorante de contraste Giemsa. Los bacilos aparecen de color rojo. Nótese que se distingue el núcleo que se halla en el centro de cada hematíe. Objetivo de inmersión, 1000 aumentos.

Técnica: a) Mezclar la cantidad de 10 c.c. de la solución N° 1 con 90 c.c. de la solución N° 2.

- b) Cubrir la preparación (en portaobjeto) con dicha mezcla recién preparada y calentar suavemente durante unos 5 minutos.
- c) Decolorar con solución alcohólica del ácido clorhídrico al 3%.
- d) Lavar con agua destilada.
- e) Efectuar la coloración de contraste con la solución de Crisoidina durante unos 5 minutos. Secar al aire; Observar en inmersión.

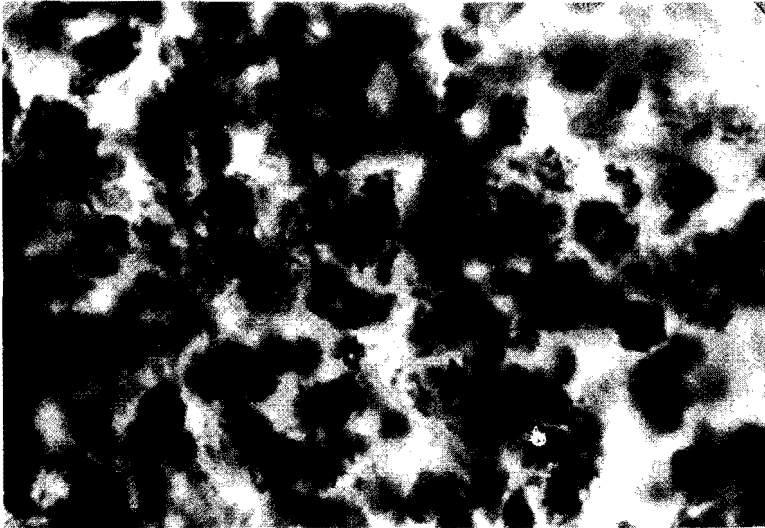
Figura 5



Aspecto microscópico de *Mycobacterium paratuberculosis* en el frotis de heces de una vaca afectada por la enfermedad de Johne. Coloración acidorresistente según Ziehl-Neelsen: los bacilos de Johne (agrupados en acúmulos característicos) aparecen de color rojo y el resto de la preparación de azul. Objetivo de inmersión, 512 aumentos.

Hoy día se sabe que la permeabilidad de la superficie de todas las micobacterias es mucho menos pronunciada que la de los bacilos no acidorresistentes, hecho que sin duda alguna juega un importante papel en el mecanismo de la difícil coloración y decoloración de los mismos. Por otra parte, la composición química de su protoplasma con un contenido alto de lípidos (20 a 40 %) que consisten principalmente de fosfolípidos y cera, y donde la fracción cérica no saponificable incluye alcoholes elevados, también guarda relación con la propiedad de la acidorresistencia. En cuanto a los alcoholes elevados, un hidroximetoxiácido saturado y denominado ácido micólico abunda en el protoplasma del bacilo tuberculoso y el ácido leprosinico se encuentra en el

Figura 6



Aspecto microscópico de *Mycobacterium paratuberculosis* en el frotis por aposición de la mucosa intestinal de un bovino en la fase final de la enfermedad de Johne. Coloración según Ziel-Neelsen: los bacilos de Johne aparecen agrupados en acúmulos peculiares dentro y fuera de células epitelioides. Objetivo de inmersión, 512 aumentos.

***Mycobacterium leprae*.** Los lipoproteidos se encuentran principalmente en los gránulos bacilares donde se combinan con la fracción gram-positiva y fracción gram-negativa de los lípidos. El núcleo (sistema nuclear) de las micobacterias contiene el ácido desoxirribonucleico, sustancia demostrable por la reacción de Feulgen, y el citoplasma alberga el ácido ribonucleico, cuya presencia puede ser evidenciada mediante la prueba de Unna-Pappenheim. Los ácidos micólico y leprosinico son fuertemente ácidosresistentes, no obstante, la cera purificada que puede contener hasta un 50% de los ácidos mencionados carece de la propiedad ácidosresistente (Fehlte y Anderson, 1948).

Figura 7



Aspecto microscópico de los bacilos de Stefansky (*Mycobacterium leprae-murium*) agrupados en acúmulos peculiares en el tejido granulomatoso de una rata afectada por la lepra de ratas (enfermedad de Stefansky). Coloración de Quandt: las micobacterias aparecen de color azul y el fondo de la preparación de amarillo. Inmersión, 640 aumentos.

Según algunos autores (Lamanna, 1946) la acidorresistencia parece ser consecuencia de una solubilidad relativamente mayor del colorante fenol en los lípidos celulares que en el agente decolorante.

Ultimamente se llegó a conocer que todas las micobacterias son en mayor o menor grado resistentes a la decoloración con ácidos minerales diluidos, soluciones de álcalis cáusticos, acetona y alcoholes.

La reacción de tinción de los bacilos de Hansen (*M. leprae*) es muy semejante a la de los bacilos de Koch (*M. tuberculosis*), sin embargo, los primeros se tiñen algo más fácilmente que los

últimos e incluso se muestran menos acidorresistentes, pero dicha diferencia no es suficientemente característica para distinguirlos.

Aubert (1950) demostró que la tinción de los bacilos acidorresistentes "en frío", es decir, sin calentamiento de la preparación, puede ser obtenida rápidamente si se agregan al colorante anilínico determinadas cantidades de sustancias disolventes, tales como trietileno de glicol, por ejemplo. Algunos autores (Zapatero, 1962) recomiendan el uso de una mezcla de fucsina fenicada con Tween 80 (fucsina tensioactiva) con la cual se colorea el bacilo acidorresistente en rojo vivo, sin necesidad de calentar.

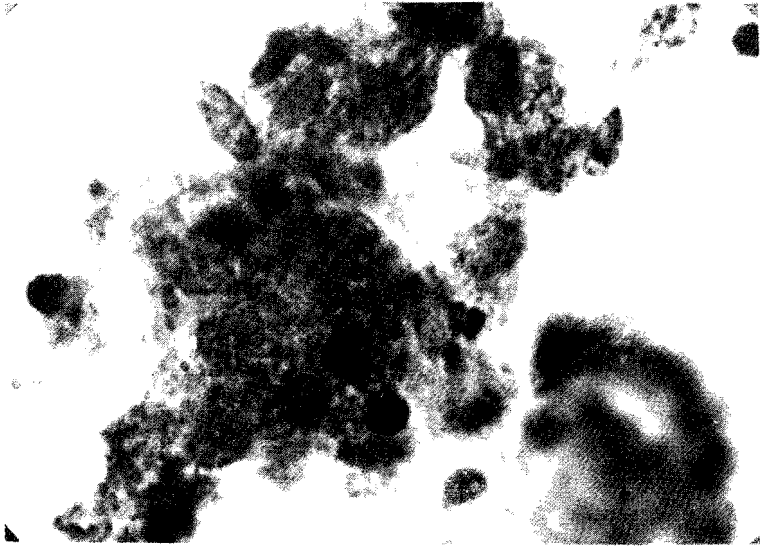
Nuestras experiencias con la fucsina tensioactiva nos permitieron comprobar la utilidad práctica del procedimiento mencionado. Sin embargo, hemos observado (Ilukevich, 1961) que para obtener una buena penetración del colorante (una mezcla de 99 c.c. de fucsina de Ziehl con 1 c.c. de Tween 80) en la célula bacteriana, la coloración "en frío" debe durar de 15 a 30 minutos, ya que el tiempo de exposición de 5 a 10 minutos que fue recomendado por Aubert se mostró insuficiente en la mayoría de las preparaciones examinadas (ver Fig. 8).

Las micobacterias pueden tomar el color de manera uniforme y aparecer en el microscopio de luz como bastoncitos homogéneos, o absorber el colorante (en frío o en caliente) de un modo discontinuo y dejarse ver como bacilos perlados o granulosos.

El bacteriólogo alemán Much, H. Ch., ya en el año 1907, ha llamado la atención de haber observado microscópicamente en el material tuberculoso de procedencia bovina o humana, unos gránulos no acidorresistentes, pero sí gram-positivos (conocidos hoy con el nombre de gránulos de Much).

Dichos gránulos pueden aparecer sueltos o situados en pequeños grupos, solos o acompañados por genuinos bacilos tuberculosos. Much los consideraba como formas no acidorresistentes del bacilo de Koch y creía que estos gránulos en circunstancias favorables dan lugar a los típicos bastones acidorresistentes.

Figura 8



Aspecto microscópico de abundantes micobacterias en el frotis por aposición de un nódulo de la oreja de hamster, a los 8 meses de inoculación artificial con bacilos de la cepa 24-M.A. Coloración ácido-resistente "en frío" según la técnica de Aubert: los bacilos amontonados en el tejido aparecen de color rojo-ladrillo, las células de azul tinto. Objetivo de inmersión. 640 aumentos.

Much ha descrito un método especial de coloración para demostración de los gránulos mencionados, aun en el material negativo para los bacilos acidorresistentes^o).

Sula y Pollak (1966) hacen saber que "algunos autores estudiaron las estructuras intra-citoplasmáticas de micobacterias por los métodos de coloración de Ziehl-Neelsen, Much, Piekarski-Robin y Feulgen y encontraron que es posible demostrar la presencia de gránulos con estos varios métodos y que tienen siempre la misma localización en la célula y por consiguiente, no son artefactos debidos a precipitación de colorantes, como lo suponen erróneamente algunas publicaciones que se ocupan de la materia".

º) Coloración de Much: se cubre el portaobjeto (frotis) con una mezcla de la solución alcohólica saturada de violeta de metilo (1 parte) y solución acuosa de ácido fénico al 2% (9 partes) y se calienta hasta embullición una o dos veces. Se lava con agua y se coloca en lugol para 5 minutos. Se lava con agua y se trata con ácido nítrico puro al 5%, durante 1 minuto. Se sumerge en ácido clorhídrico al 3% por 10 segundos. Se pone de inmediato (sin lavado) en una mezcla de partes iguales de acetona pura y alcohol etílico absoluto hasta que la preparación sea incolora. Se lava en agua. Se seca sobre la llama. Contracoloración con fucsina diluida o pardo de Bismark, durante 15 segundos. En la observación microscópica los granulos aparecen de color morado tinto, el protoplasma de morado claro y el fondo de rojizo o parduzco (según el colorante utilizado para la coloración de contraste).

Figura 9



Aspecto microscópico de gránulos de Much en caseum ganglionar tuberculoso. Coloración según Gram: los gránulos aparecen de color azul tinto, el resto de la preparación rosado o incoloro. Objetivo de inmersión, 900 aumentos.

En cuanto a la visualización de los gránulos intracelulares mediante diferentes métodos de coloración de las micobacterias, hemos observado que la combinación de las técnicas de Ziehl-Neelsen y de Giemsa proporciona imágenes microscópicas de extraordinaria nitidez. He aquí el procedimiento de coloración desarrollado por nosotros:

Una vez secado al aire se fija el frotis con alcohol metílico (3 - 5 minutos) o por el calor.

Reactivos:

Fucsina fenicada: Solución de 10 grs. de fucsina
básica de alcohol etílico al 95% 10 c.c.
Solución acuosa de fenol al 5% 90 c.c.

Decolorante: Acido clorhídrico concentrado 2 c.c.
Alcohol etílico al 95% 98 c.c.

Colorante de fondo: Solución madre de Giemsa
(Azur-eosina-azul de metileno) 8 c.c.
Agua destilada tamponada hervida 92 c.c.

Nota: Para eliminar el ácido carbónico se aconseja emplear agua tamponada que se obtiene, según Weise (1955) disolviendo 0,49 grs. de fosfato monopotásico y 1,14 grs de fosfato disódico en un litro de agua destilada y hervida.

Técnica:

a) Efectuar la extensión o hacer frotis por aposición, si se trata de fragmentos de órganos. Una vez secado al aire fijar la preparación por el calor moderado.

b) Cubrir la preparación con la fucsina fenicada y calentar durante diez minutos hasta que se forman vapores, pero sin hervir.

Escurrir la solución colorante.

c) Decolorar con alcohol-ácido clorhídrico hasta que las partes más finas de la preparación no tengan colorante y las más

gruesas aparezcan de color rosado pálido. Lavar con agua destilada.

d) Cubrir la preparación con la solución diluida del colorante de Giemsa recién preparada. Teñir durante 30 minutos. Lavar con agua destilada y secar el frotis colocándolo en posición vertical.

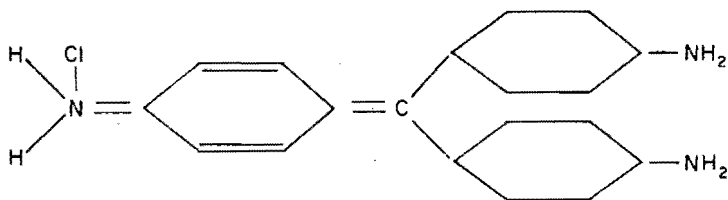
El examen microscópico de las preparaciones se realiza por inmersión en aceite y sin cubreobjetos. Las micobacterias se tiñen de color rojo vivo y los gránulos citoplasmáticos de azul tinto. No raras veces el diámetro de los gránulos mencionados supera al del bacilo y su situación es generalmente terminal o subterminal. Casi siempre se ve un gránulo por cada bacilo, sin embargo, ocasionalmente el bacilo puede contener varios gránulos o también estos pueden aparecer sueltos, es decir, fuera del cuerpo bacilar. Dichos gránulos no son alcohol-ácido-resistentes y por lo tanto responden a la coloración de fondo que en nuestro caso consiste en aplicación del colorante de Giemsa (mezcla de eosina, azul de metileno y metileno de azur o Azur II). Debemos señalar que el método propuesto por nosotros ofrece las siguientes ventajas:

- 1° Las micobacterias procedentes tanto de cultivos artificiales como de material patológico pueden ser estudiadas en relación con la formación de los gránulos característicos.
- 2° La composición citológica del fondo de las preparaciones (de impresión o frotis de órganos) puede ser diferenciada debidamente gracias a la nítida visualización de las células hísticas y de la sangre, incluyendo otros elementos accidentales o patognomónicos.
- 3° El método mencionado facilita la realización de estudios sobre virulencia y patogenicidad de las cepas de micobacterias ricas o pobres en gránulos citoplasmáticos, hecho que puede tener singular importancia en las investigaciones leproológicas, ya que Shepard (1961, 1965) y otros investigadores (Rees y Valentine, 1962) han demostrado mediante inoculaciones en la planta podal del ratón blanco que, solamente los bacilos teñidos homogéneamente con la técnica de Ziehl-Neelsen representan formas viables del *M. leprae*.

No obstante, varios autores (Yegian y col., 1942, 1943) indican que la composición química del colorante influye mucho en el aspecto microscópico del bacilo acidorresistente.

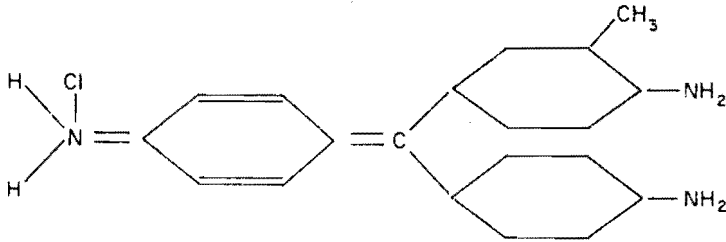
Extensiones coloreadas con acetato de rosanilina o para-rosanilina muestran en general cuerpos bacilares ricos en gránulos; sin embargo, las preparaciones tratadas con el cloruro de rosanilina o para-rosanilina ofrecen microorganismos en su mayor parte teñidos por igual. Los autores mencionados sostienen que la cantidad de grupos de metilo en la molécula del colorante anilínico determina la intensidad del matiz rojo. La fucsina básica comercial se compone, corrientemente, de los siguientes tres colorantes: para-rosanilina, rosanilina y magenta II.

La para-rosanilina, cuya fórmula estructural es la siguiente:



Pararrosanilina

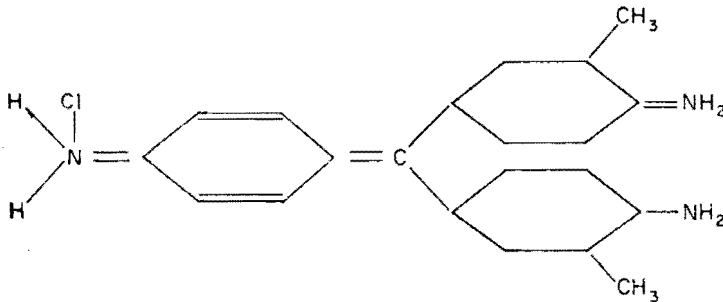
carece de grupos metilo, y por lo tanto es la de matiz rojo más débil. La rosanilina, como lo puede apreciar en la fórmula anexa,



Rosanilina

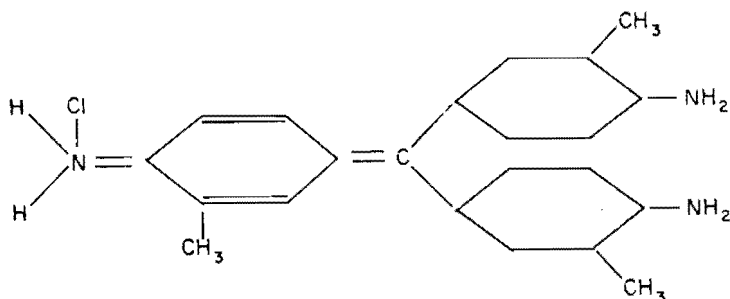
posee un grupo metilo y demuestra un matiz rojo de intensidad intermedio entre los mencionados.

Magenta II es un colorante cuya molécula se destaca con dos grupos metilo, y es la de matiz rojo más intenso.



Magenta II

Además de los compuestos mencionados existe un colorante rojo denominado Neofucsina. La molécula de este variante contiene tres grupos metilo, y según Salle (1957) proporciona a los microorganismos ácido-resistentes el mejor grado de diferenciación o contraste que se consiga. Su fórmula estructural es la siguiente:



Neofucsina

Para la observación microscópica de bacilos tuberculosos, ya hace tiempo, utilizan frotis teñidos con colorantes fluorescentes, particularmente con Auramina. Los gérmenes teñidos de este modo aparecen en el campo de visión alumbrado con luz ultravioleta, en forma de bastoncillos amarillentos o ligeramente azuláceos, luminosos y brillantes; los saprófitos, sin embargo, muestran un grado de fluorescencia mucho menor que los verdaderos bacilos de Koch. Según Richards y Miller (1941), Hagemann y Herrman (1954), y Steffen (1961), el método de fluorescencia puede proporcionar hasta un 30% más de hallazgos positivos que el de Ziehl - Neelsen. A continuación describiremos la técnica de coloración fluorescente recomendada por Steffen:

Reactivos:

1) Solución de Auramina fenicada:

Auramina..... 1 gramo
 Agua destilada..... 1 litro (filtrar por el filtro de papel).
 Fenol en cristales...2,5 grs.
 Agua destilada..... 50 cc.
 Mezclar las dos soluciones.

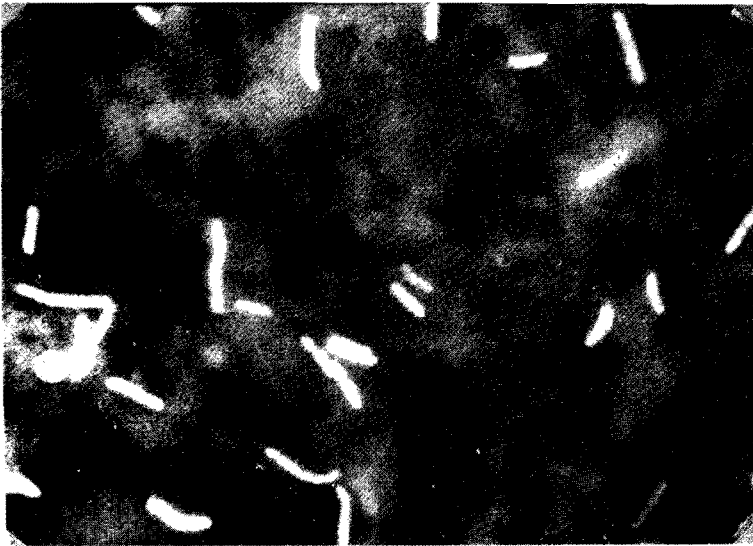
2) Solución de alcohol ácido:

Acido clorhídrico concentrado.....1 cc.
 Alcohol etílico al 95%.....999 cc.
 Cloruro de sodio (como estabilizador).....4 grs.

Técnica:

- a) Extender y fijar la preparación por el calor en la estufa a 120°C durante 15 minutos.
- b) Teñir con solución de Auramina fenicada durante 15 minutos. Lavar con agua.
- c) Decolorar en alcohol-ácido durante 3 minutos. Lavar con agua. Secar.
- d) Observar en microscopio con inmersión. Utilizar aceites de inmersión no fluorescentes o el aceite de parafina. Trabajando con filtros negros (Zeiss UG2 y UG5), es decir, con los que permiten el paso de rayos ultravioletas, no olvidar de colocar filtros oculares amarillos (Zeiss GG4) con el fin de prevenir posibles daños de los ojos.

Figura 10



Aspecto microscópico de *M. tuberculosis*. Coloración fluorescente según Steffen. Se observa un alto grado de fluorescencia bacilar. Luz ultravioleta. Objetivo de inmersión, 1200 aumentos.

Transparencia cedida amablemente por la Prof. Dra. Gertrudis Meissner, Borstel, Alemania.

La coloración de cortes histológicos con fluorocromos puede ser realizada muy satisfactoriamente con el siguiente método, propuesto por Mc Clure: Material: fragmentos de tejido fijados en sol. de formol al 10% durante algunos días.

Inclusión en Parafina.

Realización de cortes con el microtomo.

Desparafinización de los cortes en Xylol.

Hidratación de los cortes con serie de alcoholes de graduación decreciente.

Colorante:

Auramina O	1,5 gramos
Rhodamina B	0,75 "
Glicerina	75 cc
Cristales de Fenol (fundidos en 50° C).....	10 cc
Agua destilada	50 cc

Coloración:

- a) Colorear durante 20 minutos a 60°C
- b) Lavar con agua corriente
- c) Diferenciar durante 1 a 2 minutos en sol. alcohólica (alcohol etílico al 70% de HCl al 0,5%
- d) Lavar con agua corriente
- e) Secar el preparado con filtro
- f) Sumergir dos veces repetidas en alcohol absoluto (etílico o isopropílico)
- g) Sumergir brevemente en Xylol
- h) Montaje de laminillas en EUKITT

Microscopía de fluorescencia: (luz azul); Bacilos tuberculosos aparecen de color amarillo- rojo luminiscente; el tejido (fondo) se destaca por el color verde pálido.

Diferenciación de bacilos vivos de muertos: Strugger señala sobre la posibilidad de diferenciar las bacterias vivas de las muertas por medio de fluoro-cromatización de suspensiones bacilares con Acridina anaranjada (Acridin Orange). El colorante aplicado en concentración de 1:10.000 durante 4 a 5 minutos

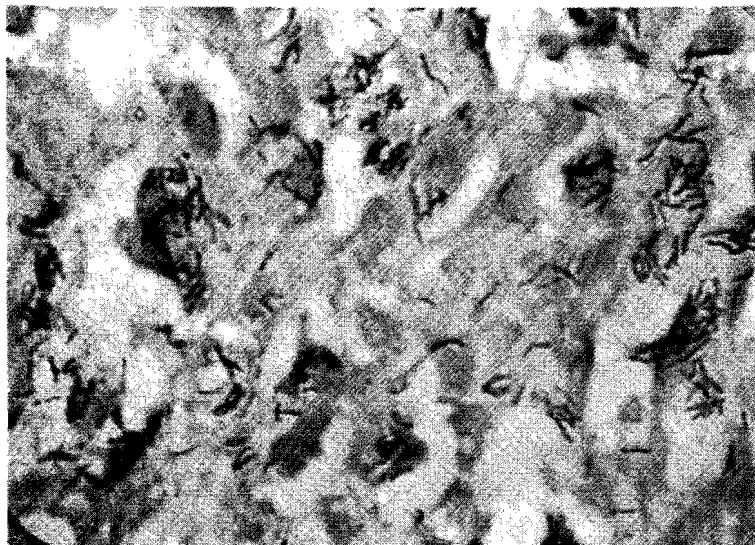
transfiere a los gérmenes vivos un color verde brillante, dejando en el mismo tiempo las bacterias muertas teñidas de rojo.

En cuanto a las particularidades tintóreas del *Mycobacterium leprae*, se han comprobado (Shepard y col., 1965) que solamente los bacilos sólidos, es decir, homogéneamente teñidos representan las formas viables y que los no teñidos completa y uniformemente constituyen el contingente de los gérmenes degenerados o muertos.

Es muy característica la localización del *M. leprae* en el tejido de los afectados por diferentes formas de la enfermedad de Hansen. Así, en la hanseniasis lepromatosa y dimorfa los bacilos son muy abundantes y suelen aparecer dentro de las células en agrupaciones esféricas denominadas "globi", pero también se encuentran libres en los espacios linfáticos. En la hanseniasis tuberculoide, por el contrario, el número de los bacilos es muy reducido y éstos aparecen sueltos, sin formar "globi".

Para la demostración del *M. leprae* en el tejido (en cortes histológicos) se emplea la técnica de Fite y col. (1947) o una de sus modificaciones, procedimiento que según Wheeler (1959), se muestra superior al método clásico de Ziehl-Neelsen. Los cortes del material sospechoso no deben ser expuestos al alcohol absoluto ya que el *M. leprae* es algo sensible a la decoloración alcohólica. Para obtener buenos resultados con material procedente de pacientes tratados durante un tiempo prolongado con drogas antibacterianas es necesario adoptar el método de "re-encapsulación" del bacilo, con el fin de obtener el valor completo de la coloración acidorresistente. El corte histológico debe ser sumergido en la trementina pura durante dos horas, luego coloreado con fucsina de Fite (neofucsina o magenta III - 0.5 gr.; ácido fénico cristalizado - 5 gr.; alcohol etílico o metílico absoluto - 10 ml. y agua destilada - 100 ml.) y sometido a la decoloración en alcohol-ácido (ácido clorhídrico concentrado - 0,5 ml.; alcohol al 70% - 99.5 ml). Finalmente se emplea la hematoxilina de Harris (hematoxilina - 1 gr.; alcohol etílico absoluto - 10 ml.; alumbre potásico - 70 gr.; agua destilada - 200 ml.; óxido de mercurio - 0.5 gr.) para la coloración de fondo.

Figura 11



Aspecto microscópico de bacilos de Hansen (*Mycobacterium leprae*) en el tejido lepromatoso humano. Coloración de Fite- Faraco. Objetivo de inmersión, 640 aumentos.

Finalmente debemos señalar que todas las micobacterias son consideradas como grampositivas. No obstante, dichos microorganismos se colorean con dificultad con el método mencionado por cuanto contienen grandes cantidades de cera no saponificable, sustancia que obstaculiza la penetración del colorante al

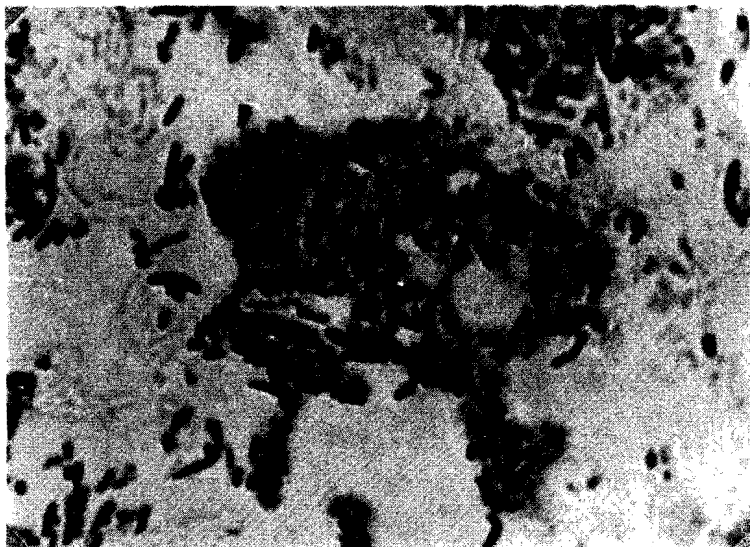
Figura 12



Microfotografía de globi formados por el *M. bubalorum* en el tejido lepromatoso de un búfalo afectado por la lepra. Coloración de Fite- Faraco. Inmersión, 1000 aumentos. (Material patológico cedido por el Dr. Chapman Binford, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.).

interior del bacilo. Al modificar ligeramente la técnica de Gram, es decir, al calentar brevemente la preparación cubierta con la solución de carbol-gencian-violeta, hemos logrado obtener perfectas coloraciones en el lapso señalado en la técnica original para la coloración de gérmenes no acidorresistentes (ver Fig. N° 13).

Figura 13



Aspecto microscópico de *M. tuberculosis* de un cultivo puro. Coloración de Gram modificada (calentando la preparación). Objetivo de inmersión, 1000 aumentos.

ESTRUCTURA MICROSCOPICA, ULTRAMICROSCOPICA Y FUNCIONAL DE LAS MICOBACTERIAS

1. Gránulos citoplasmáticos

La primera noticia sobre la existencia de unos corpúsculos microscópicamente apreciables en el citoplasma de los bacilos tuberculosos procede del mismo Roberto Koch (1882), quien en

su histórico trabajo denominado "La etiología de la tuberculosis" afirma que" bajo ciertas circunstancias estos bacilos forman esporos en el cuerpo animal, cada uno de 2 a 4, de forma ovalada, que están distribuidos en intervalos iguales a lo largo del bacilo" ... Un cuarto de siglo después, Much (1907) los describe como gránulos citoplasmáticos que constituyen una fase muy importante en el ciclo evolutivo de los gérmenes en cuestión y cree que éstos, como lo hemos mencionado anteriormente, se transforman ocasionalmente en típicos bastoncitos acidorresistentes.

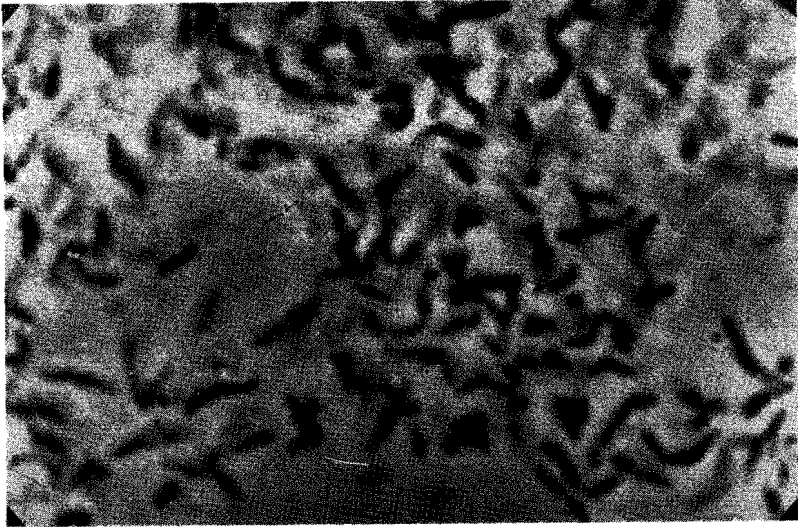
En la actualidad algunos investigadores afirman que el rasgo más característico de los microorganismos acidorresistentes es la formación de los gránulos mencionados (Sula y Pollak, 1966).

Dicha estructura granular de las micobacterias puede ser demostrada en preparaciones en fresco observadas microscópicamente al contraste de fases. En nuestros ensayos hemos utilizado el condensador IVZ/6 y objetivo acromático 100/25 Ph para inmersión de aceite, con protección de la preparación. En el material procedente de cultivos primarios no raras veces hemos podido observar la existencia de abundantes gránulos intracelulares (ver Fig. 14).

En cuanto al tamaño de los gránulos, éste según algunos autores (Sula y Pollak, 1966), varía entre 350 y 500 milimicras. Sin embargo, hemos podido observar (Ilukevich, 1969) que no raras veces el diámetro del gránulo intraplasmático supera el ancho del bacilo acidorresistente cuyas dimensiones transversales, por su parte, pueden alcanzar 0,7 y hasta 0,8 micras (ver Fig. 15).

Sula y Pollak (1966) y Pollak (1972) en concordancia con las investigaciones de Bradfield (1956), Mitchell (1959), Marr (1960) y Youmans y Youmans (1965) opinan que los gránulos citoplasmáticos pueden ser considerados como equivalentes de mitocondrias (existentes en las células de organismos superiores) ya que tanto los unos como los otros se colorean con el verde Janus B, reducen el cloruro de trifeniltetrazólide a formazán insoluble, captan el azul de indofenol después de tratar el bacilo acidorresistente con reactivos de Nadi (alfa-naftol y dimetil-p-fenilendiamina) y muestran un elevado potencial de óxido-

Fig. 14



Aspecto microscópico en contraste de fases del cultivo primario de la cepa 24-MA (micobacterias no-fotocromógenas del III grupo de Runyon aisladas del tejido lepromatoso humano). Se observa bacilos con gránulos intracelulares. Objetivo de inmersión, 1000 aumentos. Proyectivo 6,3.

reducción. Esta última particularidad puede ser demostrada por la capacidad de reducir el telurito de potasio (TeO_3K_2 - polvo blanco soluble en agua) a telurio metálico (Te), reacción manifiesta por una coloración negra intensa de los gránulos que al examen microscópico aparecen en forma de cocos ya que el resto del cuerpo bacilar no reduce el telurito y permanece incoloro.

Se sabe que las mitocondrias representan la parte muy activa del quimismo celular y que contienen sustancias necesarias para el crecimiento y división celular y que dentro de su estructura muy compleja se encuentran diferentes enzimas del ciclo de

Figura 15



Aspecto microscópico de un bacilo alcohol-acidorresistente (cepa 24-MA) con gránulo citoplasmático, cuyo diámetro supera el ancho del bacilo. Objetivo de inmersión, 2000 aumentos. Proyectivo, 6,3.

Krebs, el ácido adenosintrifosfórico y proteínas ferroporfirinasadas (citocromos), entre otras sustancias de importancia vital.

Por otra parte Burrows (1969) afirma que, "así, pues, si estos gránulos bacterianos pueden no ser mitocondrias, está comprobado que tienen actividad enzimática".

Gracias a las técnicas de microscopía electrónica que permiten el estudio de las micobacterias seccionadas transversal, oblicua o longitudinalmente, se pueden distinguir tres estructuras diferentes en el citoplasma examinado:

- a) Formaciones relativamente grandes (de unos 300 a 350 milimicras de diámetro), densas y bien definidas que a veces

presentan unas zonas más condensadas que otras (Castañé Decound, 1972). Estas formaciones, muy probablemente corresponden a los gránulos apreciables con el microscopio de luz.

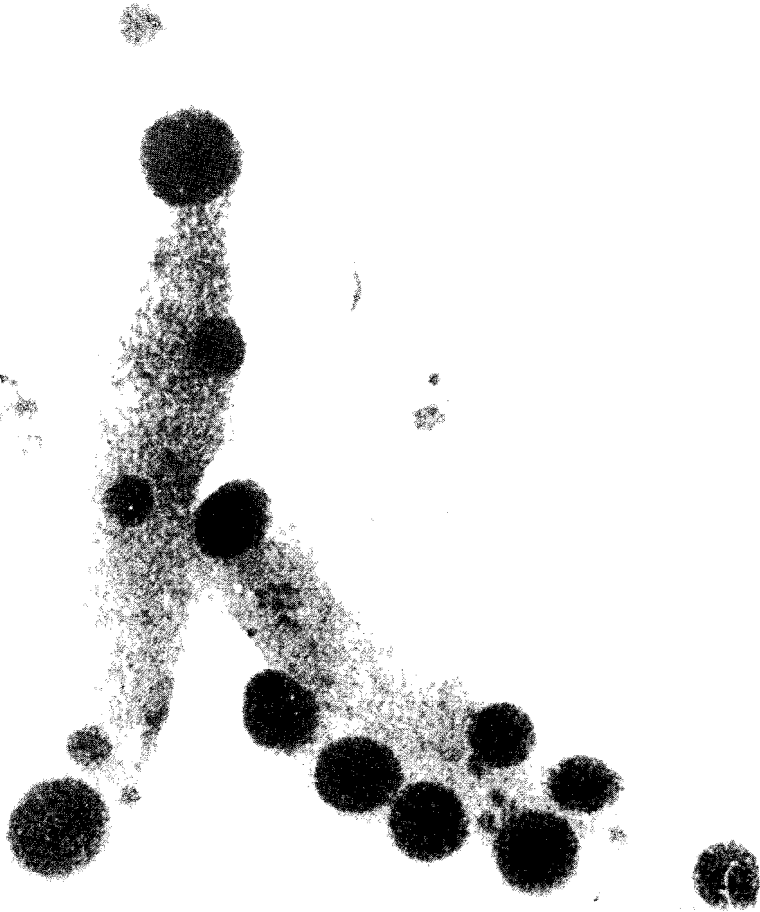
- b) Estructuras ultramicroscópicas que no raras veces se dejan ver como gránulos de unos 20 a 50 milimicras de diámetro. Lembke (1947) logró demostrar que el bacilo de Koch no se presenta siempre en forma y dimensiones constantes, sino que produce de vez en cuando unos gránulos más grandes o más pequeños. Los gránulos más pequeños alcanzan tamaño ultravioleta y pueden pasar filtros de Seitz, Berkefeld o Chamberland. Posteriormente, Takeya y col. (1954), Mudd, Takeya y Henderson (1956), Mudd, Yoshida y Koike (1958), Takeya (1959), Imaeda, Convit, Ilukevich y Lapenta (1962), y Kolbel (1970), llegaron a la conclusión de que dichas formaciones no representan el aparato nuclear, sino son unos acúmulos de sustancias energéticas, generalmente polifosfatos, cuyo significativo funcional, guarda relación con la actividad enzimática de la célula bacteriana.

Marr (1960), basándose en resultados de las investigaciones químicas de los productos obtenidos mediante destrucción de la célula bacilar (por ultrasonido o por ultratrituración) y diferenciados por centrifugación, opina que los gránulos submicroscópicos pueden llevar a cabo el transporte de electrones, así como la oxidación de ácidos orgánicos, característica funcional que guarda relación con la de los gránulos apreciables por el microscopio de luz.

Sin embargo, todavía se queda por aclarar si las partículas más voluminosas se generan por confluencia de los gránulos citoplasmáticos menores o por el contrario, estos últimos representan formas ultramicroscópicas correspondientes a los productos de desintegración de los gránulos apreciables por el microscopio de luz.

Merece ser recordado que el investigador brasileño Fontés (1910), fué el creador del concepto de fase filtrable en la vida de las bacterias en general y de las micobacterias en particular.

Figura 16



Aspecto ultramicroscópico del *Mycobacterium avium* con múltiples gránulos citoplasmáticos, 40.000 aumentos. (Cortesía del Dr. M. Rolle, Munich, Alemania).

El autor mencionado participó sobre la existencia de elementos filtrables y virulentos en el material tuberculoso. Filtraba el pus ganglionar de un acure tuberculoso, por bujías de Berkefeld. El examen microscópico del filtrado resultó negativo para microorganismos acidorresistentes, no obstante, su inoculación en otros animales reveló en uno de los acures sacrificados a las dos semanas de la inyección, un aumento de tamaño del ganglio linfático regional, también, con baciloscopia negativa. Una parte de este ganglio fue inoculada a otros dos acures, uno de los cuales fué sacrificado un mes más tarde, y en las preparaciones del sitio de inoculación se logró observar microscópicamente unos gránulos, pero no se vio formas bacilares. El otro animal murió a los cinco meses de la inoculación, sin presentar en la necropsia lesiones apreciables; sin embargo, en los frotis de los pulmones se notificó una pequeña cantidad de bacilos acidorresistentes característicos. Fontés concluyó que los gránulos de Much más pequeños pueden atravesar los filtros bacterianos y determinar en los animales inoculados una tuberculosis atípica.

Los resultados obtenidos por Fontés despertaron gran interés entre los científicos, y un poco más tarde aparecieron numerosos trabajos sobre el tema, en los cuales unos de los autores participaban de haber podido comprobar las observaciones hechas por el investigador brasileño, y otros las negaban rotundamente. Entre los que negaban la exactitud de las observaciones de Fontés se encontraban en su mayor parte los investigadores de escuela alemana, y entre los que han podido comprobar la patogenicidad de los filtrados tuberculosos, se destacaban los científicos franceses, tales como Calmette (1928), y Vaudremer (1935). Hoy día, como lo hemos mencionado, no se duda más en la existencia de los gránulos filtrables, no obstante, no se ha podido comprobar todavía que estos gránulos se convierten de nuevo en micobacterias típicas.

c) Zonas ópticas de escasa densidad electrónica que en combinación con áreas de condensación más pronunciada y elementos osmiófilos proporcionan imágenes representativas de diferentes organelos celulares y de otras formaciones que caracterizan la ultraestructura de las micobacterias.

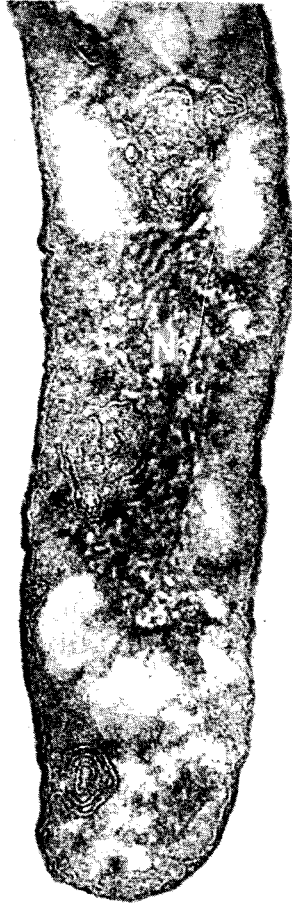
2. **Sistema nuclear:** Imágenes electrónicas ponen de manifiesto la variable disposición de la sustancia nuclear en el citoplasma. Consta de varios cuerpos cromáticos que acusan la presencia del ácido desoxirribonucleico (DNA) que es un específico constituyente del núcleo celular, o mejor dicho, de los genes que determinan la reproducción. Hollande (1962), opina que no existe un núcleo bacilar bien individualizado en virtud de que la cromatina se destruye periódicamente y se rehace en sitios diferentes del citoplasma. Koelbel (1970), señala que existen diferentes fases fisiológicas del núcleo bacilar, hecho que explica parcialmente su polifacética morfología en preparaciones estudiadas a nivel electrónico.

La totalidad de la sustancia nuclear dispersa en el citoplasma corresponde funcionalmente al "cromosoma" bacilar. Este "cromosoma" es constituido principalmente por DNA que en forma de "hilos" muy finos ocupa los espacios nucleares desprovistos de membranas o cubiertas apreciables. La extraordinaria longitud de la molécula de DNA supera en varios cientos de veces la longitud del bacilo mismo y determina que el aparato nuclear aparece compuesto de numerosos filamentos paralelos, espiralados o apilados, por falta de espacio de expansión. En la figura N° 17 se puede apreciar el aparato nuclear de *M. leprae* compuesto por los "hilos" mencionados.

En virtud de lo expuesto, el núcleo de las micobacterias más bien puede ser denominado "sistema nuclear", "aparato nuclear", "complejo de cuerpos cromáticos", "equivalentes nucleares" o "nucleoides y carioides".

3. **Membrana citoplasmática:** El cuadro electrónico demuestra que dicha membrana es compuesta de dos capas, una de las cuales es la interna y otra la externa. Según los trabajos de Zapf (1957), Imaeda y Ogura (1963) y Koelbel (1970), la membrana citoplasmática puede formar invaginaciones de estructura "multivesicular o lamelar" que penetran en el citoplasma. Los pliegues de la capa interna envuelven el laberinto membranoso formado por invaginación sucesiva y de esta manera lo separan del citoplasma. De acuerdo con los estudios de los autores mencionados, la membrana ci-

Figura 17



Fotografía electrónica de *M. leprae*. "N" muestra el aparato nuclear compuesto de "hilos" de sustancias densas, sin membrana nuclear específica. 200.000 aumentos (aumento directo 40.000 diámetros). *Nota:* Material fijado en tetraóxido de osmio al 1% (6 horas) y taponado con 2-4-6-Colidina (0.2M) a pH - 7.35. Deshidratado con acetona e incluido en una mezcla de n-butil (80%) y metil metacrilato (20%). Seccionado con ultramicrotomo equipado con la cuchilla de FERNANDEZ MORAN. Coloración de acetato de uranio al 2% durante 15 minutos. (Tomado de Ilukevich y colaboradores, 1964).

topasmática contiene ciertas enzimas, hecho que aumenta la capacidad fermentativa de la célula y por ende estimula su actividad funcional. Koelbel (1970), supone que el sistema de las membranas intracitoplasmáticas, funcionalmente, corresponde a la acción de las mitocondrias y por lo tanto propone denominar este importante organelo como “**mitocondrion bacteriano**”. Pollak (1972), señala que “además se ha podido demostrar que este sistema tiene relación íntima con la división celular”.

4. **Ribosoma:** En el citoplasma se encuentra un gran número de ribosomas que aparecen en forma de gránulos de poca intensidad electrónica y de tamaño variable: todos ellos guardan estrecha relación con la síntesis de proteínas.

De acuerdo con las investigaciones de McQuillen (1965), el ácido ribonucleico (RNA) citoplásmico puede separarse en 3 grupos, según sus funciones:

- 1° RNA ribosómico (r-RNA)
- 2° RNA de transferencia de aminoácidos (t-RNA) y
- 3° RNA mensajero (m-RNA)

Los ribosomas en la célula bacteriana están reunidos por tiras de m-RNA, sin embargo, su función en la síntesis proteínica depende de la acción coordinada de los otros dos tipos de RNA, del número determinado de aminoácidos y de energía de acción, resultante de la hidrólisis de trifosfato de guanosina. Esta última sustancia es indispensable como fuente de energía para todos los sistemas de sintetizadores de proteína.

La hidrólisis de los complejos aminoacilicos, por su parte, proporciona la energía necesaria para la formación de enlaces de péptido. Ambas reacciones mencionadas son catalizadas enzimáticamente.

El número de los ribosomas que funcionan como centros de la síntesis de proteínas se aumenta notablemente en las cercanías del aparato nuclear, durante la fase logarítmica de la reproducción micobacteriana.

5. **Pared celular:** De acuerdo con las investigaciones ultraestructurales referidas al bacilo de Hansen (Imaeda y Convit, 1962; Imaeda y Ogura, 1963, Castañé-Decoud, 1972), bacilo de la lepra murina (Chapman, Hanks y Wallace, 1959; De Souza Araujo, 1960), bacilos de la tuberculosis humana, bovina y aviaria (Shinohara y col., 1957 y 1958; Zapf, 1957 y 1959; Koike y Takeya, 1961; Koelbel, 1970) y micobacterias no clasificadas (Imaeda, Convit, Ilukevich y Lapenta, 1962), la pared celular está compuesta por tres capas de diferente densidad electrónica. Su espesor varía desde 6 a 10 milimicras (Imaeda y Convit, 1962).

Koelbel (1970) afirma que la pared celular de las micobacterias se forma de dos capas principales, es decir, de la membrana interna o "sostén" y de una capa superior; la primera se caracteriza por densidad óptica muy pronunciada y la última es casi transparente. La envoltura periférica del bacilo, según el autor mencionado, tiene su origen en las sustancias fagocitarias del medio exterior.

En cuanto, al significativo funcional, se atribuye a la pared celular una importancia de carácter inmunológico.

6. **Conjugación:** En uno de nuestros trabajos anteriores (Ilukevich y col., 1964) hemos mencionado que determinadas imágenes electrónicas reflejan fases de reproducción de las micobacterias que parecen apoyar el concepto de "polaridad sexual" emitido por Hayes (1952) y sostenido posteriormente por Xalabarder y Barnils (1962). Al observar la documentación foto-electrónica presentada por los autores mencionados se puede concluir que las micobacterias no se reproducen únicamente por partición binaria, sino que se multiplican, también, mediante ramificaciones genéticas extracelulares fusionadas en una masa única, de la cual posteriormente se forman nuevas bacterias hijas.

Koelbel (1970) supone que el acercamiento "íntimo" de dos bacterias polarizadas genéticamente, constituye el acto de conjugación en el cual una de las células involucradas actúa como donador y la otra como receptor del material "sexual". Sin embargo, Koelbel opina que la interpretación de estas imágenes, todavía, merece un estudio más profundo.

Finalmente debemos mencionar ciertas particularidades características para algunas especies de micobacterias estudiadas electrónicamente. Así el bacilo de la tuberculosis se destaca por la presencia de una sustancia densa denominada "cuerpo A" ("A-Body") que se vacuoliza fácilmente con el bombardeo electrónico (Pollak, 1972). En la actualidad sabemos que la sustancia mencionada representa acúmulo de polifosfatos y de poly-beta-hydroxybutyrato (Imaeda, 1963), elementos necesarios para la generación de la energía bacilar, tanto en el *M. tuberculosis* como en todas otras especies micobacterianas estudiadas.

En cuanto al *M. Leprae*, Imaeda (1963) señala que los cuerpos polifosfáticos y el sistema membranoso intracitoplasmático no pueden ser localizados en bacilos en degeneración, hecho que podría indicar la actividad bacteriana en las lesiones hansenianas.

Figura 18

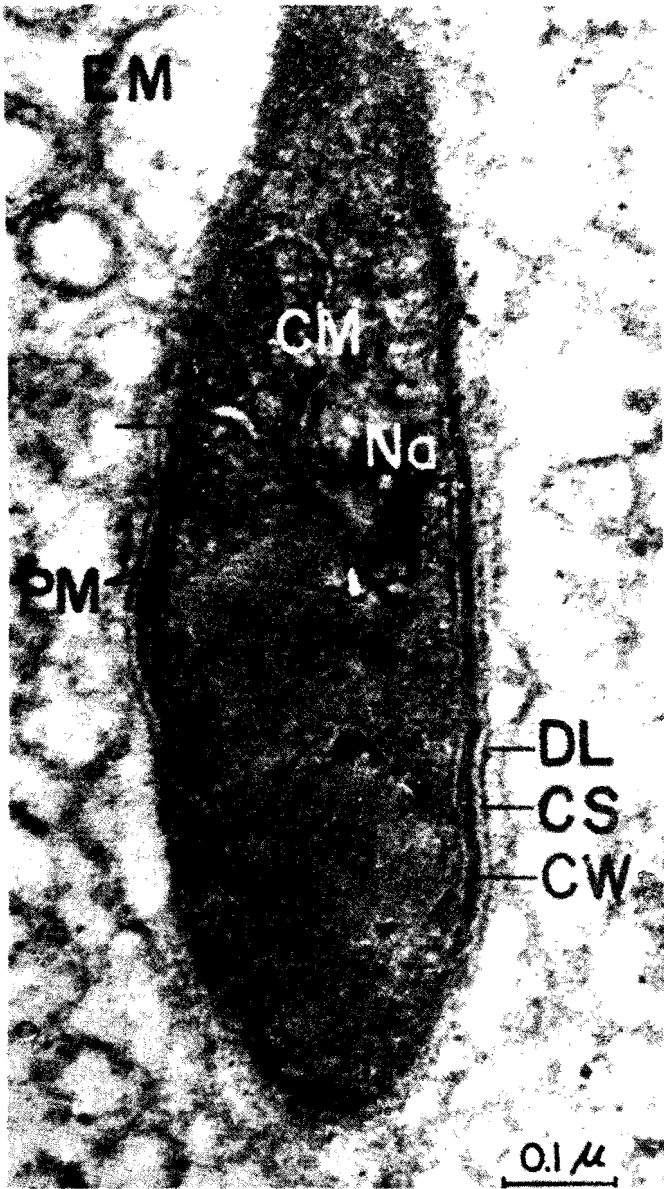


Fig. 18: Fotografía electrónica de ultraestructura de *Mycobacterium* sp.

(perteneciente al III grupo de Runyon) aislado de granuloma de un hamster infectado artificialmente. Seccionado longitudinalmente con ultramicrotomo equipado con la cuchilla de FERNANDEZ MORAN. Coloración de acetato de uranio. 120.000 aumentos. (tomado de IMAEDA, CONVIT, ILUKEVICH y LAPENTA, 1962).

Descripción de signos:

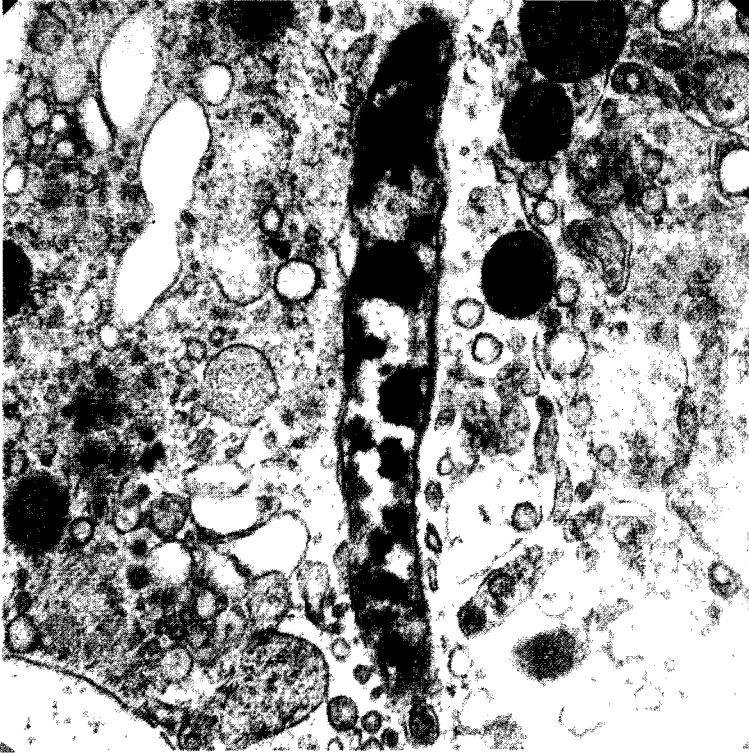
- CM — Membrana plasmática penetrada en el citoplasma en forma de invaginación intracitoplasmática.
- Na — Aparato nuclear
- PB — Gránulos polifosfáticos
- EM — Membrana o envoltura externa (Enclosing membrane) de carácter fagocitario, probablemente.
- CW — Pared celular (Cell Wall)
- CS — Envoltura de baja densidad electrónica
- DL — Capa difusa externa
- PM — Membrana plasmática compuesta de dos densas capas separadas por un espacio menos denso.

Figura. 19



Microfotografía de *Mycobacterium leprae* (L B) en una lesión granulomatosa en la oreja de hamster infectado artificialmente. La flecha indica una formación membranosa que induce la división del bacilo. 40.000 aumentos (Tomado de Imaeda, Convit, Ilukevich y Lapenta).

Figura 20



Mycobacterium sp. en una lesión granulomatosa en la oreja de hamster infectado artificialmente con la cepa de bacilos acidorresistentes aislados y cultivados en Lowenstein—Jensen a partir de lesión lepromatosa humana (IMAEDA, 1961). Se nota intensa vacuolización del citoplasma bacilar. 40.000 aumentos.

PARTICULARIDADES BIOQUIMICAS DE LAS MICOBACTERIAS

1. Vitaminas.

Las micobacterias son capaces de sintetizar la mayor parte de las vitaminas del complejo B, y producir uno de los componentes del conjunto K. Esta última vitamina fue aislada por Anderson y Newman (1933) de la grasa del bacilo de la tuberculosis, soluble en acetona. Los autores mencionados determinaron que dicha sustancia aparece en forma de pigmento amarillento y que su fórmula estructural es la 2-hidroxi-3 metil-1,4 naftoquinona y le asignaron el nombre de ftiocol (Phthiocol).

Almquist (1939), demostró que el ftiocol tiene actividad antihemorrágica de vitamina K, siendo dicha sustancia el precursor de las drogas utilizadas en la actualidad con tal efecto.

En cuanto a la síntesis de las vitaminas del complejo B, los investigadores Pope y Smith (1946) fueron los primeros que observaron diferencias apreciables en la cantidad del ácido nicotínico (niacina), también del ácido para-amino-benzoico, ácido fólico e inositol (factor antialopecia), sintetizados "in vitro" por las cepas H-37 (*Mycobacterium tuberculosis*) y Ravenel (*Mycobacterium bovis*). Los autores mencionados concluyeron que "estas diferencias eran demasiado grandes para poderlas atribuir por completo a la mayor proliferación celular de las micobacterias de la tuberculosis del tipo humano".

En el cuadro N° 1 aparecen resumidos los valores obtenidos por Pope y Smith en la determinación cuantitativa de las vitaminas del complejo B sintetizadas por las dos diferentes especies de los bacilos mencionados:

CUADRO No 1:

Vitaminas sintetizadas por los bacilos tuberculosos por mililitro del medio de cultivo líquido y filtrado (según Pope y Smith, 1946).

Vitamina sintetizada	Cepa bacilar	
	H-37 (<i>M. tuberculosis</i>)	Ravenel (<i>M. bovis</i>)
Biotina	0,002 gammas	0,001 gammas
Acido fólico	0,015 "	0,002 "
Acido para-aminobenzoico	0,020 "	0,002 "
Tiamina	0,041 "	0,014 "
Riboflavina	0,330 "	0,060 "
Acido pantoténico	0,410 "	0,140 "
Piridoxina	0,440 "	0,090 "
Inositol	14,170 "	1,280 "
Acido nicotínico	37,500 "	0,740 "

Del cuadro N° 1 se desprende que la cepa H-37 (*Mycobacterium tuberculosis*) produce unas 50 veces más ácido nicotínico (niacina), unas 11 veces más inositol, 10 veces más ácido para-aminobenzoico, 7,5 veces más ácido fólico, 5,5 veces más riboflavina, y alrededor de 5 veces más piridoxina que la cepa bovina Ravenel.

Posteriormente Konno (1956, 1958), Konno y col. (1957), y Bonicke (1957) se han dedicado a la determinación cualitativa y cuantitativa del ácido nicotínico sintetizado por deferentes micobacterias, trabajos que demostraron que el *M. tuberculosis* se distingue de todas otras micobacterias por la vigorosa producción del ácido nicotínico.

Konno, desde el principio de sus investigaciones, se basaba en la sencilla reacción colorimétrica descubierta por König (1904) para la determinación de compuestos piridínicos. Posteriormente Konno y colaboradores (1958) demostraron que el contenido de la niacina bacilar puede medirse de tres modos siguientes:

- 1° Biovaloración de la niacina por su asimilación por el *Lactobacillus arabinosus*, método que según los autores mencionados se destaca por su exactitud, pero resulta bastante complicado en su ejecución.
- 2° Determinación química fotométrica (cuantitativa) del contenido de niacina en el filtrado de los cultivos líquidos sintéticos, utilizando como reactivos las soluciones de anilina y de bromuro de cianógeno.
- 3° Modificación cualitativa de la prueba mencionada, utilizando colonias o fragmentos de las mismas, directamente del cultivo sólido (primario o secundario) y suspendiéndolas, para la extracción de la vitamina hidrosoluble en 1 c.c. de agua destilada, en un tubo de ensayo. Luego se añade a la suspensión bacilar 1 c.c. de solución alcohólica de anilina al 4 por 100, y 1 c.c. de solución acuosa de bromuro de cianógeno al 10 por 100, y procede a la apreciación de la prueba.

Comparando los resultados obtenidos por los 3 métodos mencionados, Konno y colaboradores llegan a la conclusión que ... “los métodos ensayados demuestran claramente la notable diferencia en el contenido de niacina de los bacilos tuberculosos humanos y de bacilos ácido resistentes atípicos, de modo que, pueden usarse como instrumentos fidedignos para el diagnóstico diferencial. La prueba química cualitativa puede considerarse como prueba rápida para empleo clínico o fines de triaje”.

Runyon, y colaboradores (1959), modificaron el método de Konno del modo siguiente: se cubren las colonias para investigar, que se desarrollaron sobre el medio de Lowenstein-Jensen, con la cantidad de 0,5 al 1 ml. de agua destilada. A los 20 minutos de reposo se traspasa, con una pipeta graduada, la cantidad de 0,5 ml. del líquido sobrenadante a otro tubo de ensayo, anexándole enseguida 0,5 ml. de la solución de anilina al 4 por 100 en alcohol etílico al 95 por 100, y 0,5 ml. de la solución acuosa de bromuro de cianógeno al 10 por ciento. A continuación se agita suavemente el contenido del tubo y cuando dentro de unos minutos de observación aparece un color amarillo, se interpreta la reacción como positiva para la niacina.

El Centro Panamericano de Zoonosis (1973), recomienda la siguiente técnica para la determinación de la niacina bacilar: “se añade un mililitro de anilina al 4.0% en alcohol etílico al cultivo en crecimiento en el medio de Proskauer y Beck. Se añade entonces 1.0 mililitro de bromuro de cianógeno (veneno mortal). Esta prueba también puede efectuarse a partir de cultivos en cualquier medio sólido en tubos, para ello se agregan 2 ml. de agua destilada al medio, se rompen las colonias con el anza, facilitando la suspensión y se dejan los tubos inclinados durante 20 minutos. Se extrae luego el contenido líquido con una pipeta, se pasa a un tubo pequeño y en él se agregan los reactivos de la prueba. La aparición de un color amarillo a los cinco minutos indica la presencia de niacina”.

La prueba de Konno, en cualquiera de sus modificaciones, puede ser empleada con resultados satisfactorios en trabajos rutinarios de clasificación, sin embargo, la toxicidad de los vapores del bromuro de cianógeno (gas lacrimógeno) que hasta en cantidades muy pequeñas puede causar irritación de las mucosas nasales y conjuntivas oculares, impone la necesidad de trabajar bajo campana con extracción de aire.

Los autores mencionados afirman que la prueba de la niacina es patognomónica para el *M. tuberculosis* y que todas otras especies de micobacterias, salvo casos excepcionales, no sintetizan la vitamina en cuestión en cantidades apreciables en la reacción referida.

No obstante, debemos señalar que Boenicke y Ewoldt (1965) dieron a conocer que las cepas de *M. borstelense* var. *niacino-genes*, también son capaces de sintetizar el ácido nicotínico en cantidades apreciables.

Además, el Centro Panamericano de Zoonosis en su monografía denominada “Métodos de laboratorio de micobacteriología para el aislamiento e identificación de micobacterias” (1973), menciona que “se dice que el *M. fortuitum* también produce niacina”.

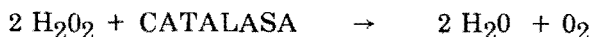
2. Enzimas.

Las micobacterias pueden sintetizar diferentes enzimas, sustancias que en la actualidad juegan un importante papel en la

clasificación bioquímica de las especies correspondientes. Las enzimas son producidas por células vivas y acusan naturaleza proteica cuya acción queda destruida a temperaturas superiores a 80°C., sin embargo, una inhibición parcial de la actividad enzimática bacteriana se manifiesta "in vitro" a partir de 56°C. El mecanismo de la acción enzimática es realmente complejo y no raras veces depende de la presencia de diferentes coenzimas y apoenzimas y de algunos iones metálicos (magnesio, manganeso, cinc, cobre o hierro) que se desempeñan como cofactores.

Las enzimas más importantes producidas por diferentes micobacterias son las siguientes:

Catalasa. Las micobacterias en general posean la capacidad de producir la catalasa, enzima capaz de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular, según la ecuación:



Middlebrook (1954) propone la siguiente técnica para la determinación de la actividad catalásica de las micobacterias: las colonias para investigar, desarrolladas en el medio de Löwenstein Jensen o Dubos se cubren con una mezcla de soluciones de peróxido de hidrógeno con tween 80. La prueba se interpreta como positiva cuando aparecen pequeñas burbujas de gas a nivel de las colonias y en la base del medio de cultivo inclinado, en los primeros 5 minutos de realizada la reacción. Se utilizan dos soluciones recientemente preparadas, de peróxido de hidrógeno al 30 por ciento y de tween 80 al 10 por ciento. Estas dos soluciones (acuosas) se mezclan a partes iguales en el momento de su uso.

Especies clínicamente significativas (*M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. paratuberculosis*) son generalmente productoras de moderadas cantidades de la enzima en cuestión; los saprófitos, es decir, especies clínicamente no significativas, generalmente producen la catalasa en cantidades abundantes.

Boenicke (1961), demostró que la importancia de la prueba de catalasa se basa principalmente en el hecho de que los bacilos tuberculosos humanos y bovinos (*M. tuberculosis* y *M. bovis*) dejan de producir la enzima cuando se hacen resistentes a la hidrazida del ácido isonicotínico (H.A.I.N.) en pruebas in vitro

(desde 10 gammas de H.A.I.N. por cada c.c. del medio de cultivo). Contrariamente a lo mencionado se comportan todas las otras especies micobacterianas, incluyendo a las micobacterias atípicas o no clasificadas, que permanecen fuertemente activas en cuanto a la producción de la catalasa, mostrándose al mismo tiempo resistentes a la hidrazida del ácido isonicotínico. El fenómeno mencionado constituye un buen método de diferenciación de los bacilos tuberculosos apatógenos de las micobacterias atípicas y de los saprófitos.

Peroxidasa. Sula y Pollak (1966), señalan que la peroxidasa está presente en los bacilos tuberculosos humanos (*M. tuberculosis*) y bovinos (*M. bovis*) solamente. Todas otras especies de micobacterias no son capaces de producir dicha enzima. No obstante, la síntesis de la peroxidasa por parte de los bacilos tuberculosos puede ceder cuando éstos se hacen resistentes a la isoniácida (H.A.I.N.).

Se sabe que las peroxidases catalizan la oxidación de sustratos por el peróxido de hidrógeno, es decir, descomponen el hidrógeno y transfieren el oxígeno liberado a otro sustrato que, de esta manera, se oxida. Dichas enzimas son generalmente proteínas de porfirina de hierro, pero a veces aparecen en forma de flavoproteínas (Gunsalus y Stainer, 1961).

Además de la catalasa y peroxidasa las micobacterias son capaces de producir numerosas otras enzimas, entre las cuales se puede mencionar: esterasas, carbohidrasas, amidasas, peptidasas, oxidasas, dehidrogenasas, y enzimas que afectan la descarboxilización oxidativa de los ácidos alfa-cetónicos.

Boenicke (1958), ha observado que algunas micobacterias pueden producir la penicilinasas pero en cantidades muy variables. Según el autor mencionado, las mayores cantidades de la penicilinasas corresponden al grupo de los bacilos acidorresistentes saprofiticos, al *M. smegmatis* especialmente, y las menores a los bacilos tuberculosos genuinos.

Numerosos autores han estudiado la asimilación de diferentes carbohidratos por las micobacterias. Las técnicas y resultados de estas investigaciones el lector puede apreciarlas en los trabajos de Kubica (1960) y Kubica y Dye (1967).

Amidasa. Corper y Sweany (1918) encontraron que los bacilos de Koch descomponen vigorosamente la urea, actividad que según las investigaciones de Tacquet y col. (1954) no es apreciable en las pruebas con cepas de procedencia bovina y aviaria.

Bónicke (1961), logró demostrar que casi todas las especies de micobacterias pueden ser identificadas y clasificadas mediante la prueba de desdoblamiento enzimático de diferentes amidas mencionadas en el cuadro No 2:

La técnica de la prueba del desdoblamiento enzimático de las amidas según Bonicke (1961) es la siguiente:

a) Preparación de suspensiones bacterianas.

Se toma con asa de platino varias colonias cultivadas en el medio de Lowenstein- Jensen, se determina su peso exacto en una balanza sensible, se suspende en solución salina isotónica y se centrifuga durante 20 minutos a 3000 r.p.m. A continuación se decanta el líquido sobrenadante, se resuspende el sedimento, se centrifuga de nuevo y se elimina el centrifugado con el fin de hacer desaparecer los posibles trazos de amoniaco adheridos a la superficie bacilar. Finalmente se suspende el sedimento en solución de suero fisiológico taponada a pH - 7,2, a razón de 10 mg. de sedimento bacilar por cada ml. de la solución taponada.

b) Preparación de las soluciones de amidas.

De cada una de las 10 amidas mencionadas en el cuadro N° 2 se preparan soluciones acuosas (0,00164 molar) y se calientan en baño maría, durante 30 minutos a los 100°C.

c) Ejecución de la prueba y su interpretación.

Se mezcla en partes iguales la suspensión bacilar y solución de la amida correspondiente y se incuba a la temperatura de los 37°C. En diferentes lapsos de incubación (de 2 a 22 horas) se toma con una pipeta graduada la cantidad de 1 ml. de la mezcla incubada y se procede a la determinación química de amoniaco en la misma, con el método de Rusell (1944), preferiblemente. La

Cuadro No. 2: La serie de las 10 amidas según Bönicke. Datos químicos.

No.	Amida y su peso molec. (PM)	Preparación de la soluc. 0,00164 */M		Reacción enzimática	
1	Acetamida PM - 59	9,68 mg. en 100 ml. agua dest.	Acet- amida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Acet-} \\ \text{amidasa}} \end{array}$	Acido acético + Amoníaco (NH ₃)
2	Benzamida PM-121	19,85 mg. en 100 ml. agua dest.	Benza- mida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Benzamidasa}} \end{array}$	Acido benzoico + NH ₃
3	Urea PM-60	9,84 mg. en 100 ml. agua dest.	Urea	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Ureasa}} \end{array}$	Acido carbónico + NH ₃
4	Isonicotina- mida PM-122	20,00 mg. en 100 ml. agua dest.	Isonicotina- mida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Isonicotina-} \\ \text{midasa}} \end{array}$	Acido + NH ₃ isónico- tínico
5	Nicotina- mida PM - 122	20,00 mg. en 100 ml. agua dest.	Nicotina- mida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Nicotina-} \\ \text{midasa}} \end{array}$	Acido nicotí- nico + NH ₃
6	Piracina- mida PM - 123	20,20 mg. en 100 ml. agua dest.	Piracina- mida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Piracina-} \\ \text{midasa}} \end{array}$	Acido piraci- nico + NH ₃
7	Salicil- amida PM - 137	22,50 mg. en 100 ml. agua dest.	Salicila- mida	$\begin{array}{c} + H_2O \\ \xrightarrow{\text{Salicila-} \\ \text{midasa}} \end{array}$	Acido salicílico + NH ₃
8	Alantoína PM - 158	25,90 mg. en 100 ml. agua dest.	Alantoína	$\begin{array}{c} + 4H_2O \\ \xrightarrow{\text{Alantoínasa} \\ \text{Alantoicasa} \\ \text{Ureasa}} \end{array}$	Acido glioxi- lico + 2CO ₂ + 4NH ₃
9	Succina- mida PM - 116	19,00mg. en 100 ml. agua dest.	Succina- mida	$\begin{array}{c} + 2H_2O \\ \xrightarrow{\text{Succinamidasa}} \end{array}$	Acido pirúvico + 2NH ₃
10	Malonamida PM - 102	16,70 mg. en 100 ml. agua dest.	Malonami- da	$\begin{array}{c} + 2H_2O \\ \xrightarrow{\text{Malonamidasa}} \end{array}$	Acido malónico + 2NH ₃

presencia de NH_3 se manifiesta por la aparición de un color azul más o menos intenso. Esta reacción puede ser interpretada colorimétricamente, sirviendo así como prueba cualitativa y cuantitativa simultáneamente.

Los resultados de dichas investigaciones enzimáticas los hemos resumido en el cuadro N° 3.

Del cuadro N° 3 se desprende que las micobacterias de crecimiento rápido (*M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei* y *M. thamnopheos*) se distinguen por su diferente actividad enzimática. Por otra parte, se puede apreciar la diferencia entre las micobacterias fotocromógenas (grupo I de Runyon), escotocromógenas (grupo II de Runyon) y no-fotocromógenas (grupo III de Runyon), por cuanto las primeras desdoblan la urea y nicotinamida, las segundas se quedan inactivas enzimáticamente (salvo algunas cepas que atacan la urea), y las últimas forman amoniaco de la nicotinamida y piracinaamida.

Es muy significativo el hecho de que el *M. avium*, *M. ulcerans* y las micobacterias de la cepa Zulia (aislada en cultivo a partir del material lepromatoso humano) aparecen en dicha prueba como idénticas con las micobacterias no-fotocromógenas (grupo III de Runyon).

Pollak (1972), señala que Juhlin redujo el número de amidas propuestas por Bonicke y añadió nuevas para la clasificación bioquímica de las micobacterias.

Nitro-reductasa.

Virtanen (1960), dio a conocer que algunas especies de micobacterias producen la nitro-reductasa que reduce los nitratos a nitritos en pruebas "in vitro". Según las investigaciones de Virtanen, las reacciones fuertemente positivas son características para el *M. tuberculosis*, y negativas para *M. bovis* y el B.C.G. Al mismo tiempo, las micobacterias de otras especies resultaron desde negativas hasta fuertemente positivas para la enzima mencionada. Así el *M. phlei*, *M. smegmatis*, y *M. ranae*, también, formaban la nitro-reductasa en cantidades apreciables, resultando el *M. muris*, *M. avium*, *M. balnei* (*M. marinum*) y *M. piscium* incapaces de realizar la reducción.

CUADRO N° 3:

Cuadro No. 3: Espectro específico de desamidación enzimática de diferentes especies de micobacterias. Tiempo de reacción - 12 horas.

Micobacteria	Acetamida	Benzamida	Urea	Isonicotinamida	Nicotinamida	Pracimamida	Salicilamida	Alantofina	Succinamida	Malonamida
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
<i>M. phlei</i>	±	-	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. thamnophaeos</i>	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
<i>M. fotocromóg. (Runyon I)</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. nofe- (Runyon I)</i> ^{og.}	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>M. escococromóg. (Runyon II)</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. avium</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. ulcerans</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
<i>M. sp. Cepa Zulia (Ilukevich*)</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-

Signos: + positivo para la reacción enzimática de Bónicke
negativo para la reacción enzimática de Bónicke

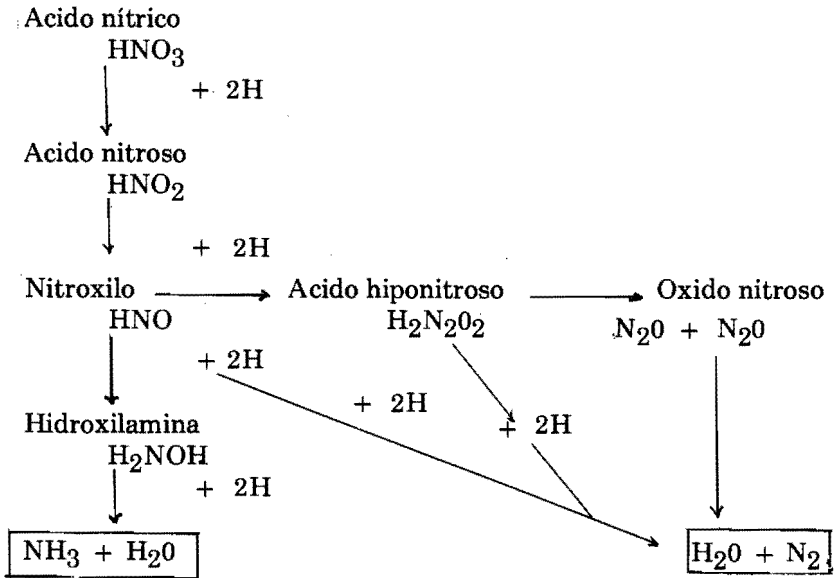
* micobacteria aislada de material lepromatoso por ILUKEVICH y col. (1969)

Ultimamente se comprobó que el *M. kansasii* (fotocromógeno) reduce los nitratos a nitritos (Divo, 1971).

En la reducción de los nitratos, éstos se convierten por la acción bacteriana enzimática en compuestos menos oxidados.

Ciertos microorganismos llevan la reducción solamente a la fase de nitritos, otros, sin embargo, conducen hasta la aparición de productos finales, los cuales consisten en: amoníaco, nitrógeno y agua.

Verhoeven (1952), ideó el esquema de la reducción de nitratos por microorganismos, el cual ofrecemos a continuación:



Además de lo mencionado, también, la desaminación de los amino-ácidos que se encuentran en los ingredientes de los medios de cultivo, trae consigo el desprendimiento de amoníaco. Se considera que dichos ácidos deben desdoblarse para convertirse en compuestos asimilables.

Se sabe que los microorganismos, en general, necesitan carbohidratos fermentables y que, donde falta un carbohidrato fermentable, ciertas bacterias, asimilan el amoniaco acumulado en el medio de cultivo. En virtud de lo expuesto la investigación de la presencia de amoniaco en los cultivos bacterianos debe ser realizada en medios sin carbohidratos (en medios sintéticos preferiblemente), ya que en el caso contrario el microorganismo puede dejar de utilizar los amino-ácidos como fuentes energéticas asimilables.

En uno de nuestros trabajos anteriores (Ilukevich, 1961) hemos estudiado la posible producción de amoniaco por diferentes micobacterias. El método empleado para este fin fue el de Eber, modificado por Ilukevich y Mora (1950) que se realizó en la siguiente forma:

Composición del reactivo:

- a) 1 parte de ácido clorhídrico concentrado de peso específico: 1,125.
- b) 3 partes de alcohol etílico al 70%
- c) media parte de cloroformo puro para análisis
- d) media parte de acetona pura para análisis

Para la preparación del reactivo debe seguirse el siguiente procedimiento: se echa el ácido clorhídrico en un envase de vidrio y se le agrega el alcohol etílico. Luego se hace aparte una mezcla de cloroformo y acetona en iguales proporciones, como quedó dicho en la fórmula y composición del mismo reactivo, y debidamente mezclados y agitados el cloroformo y la acetona, se añaden al recipiente que contiene el ácido y el alcohol, agitándose muy bien nuevamente la solución.

La técnica que empleamos en las averiguaciones del amoniaco de las cepas bacterianas es la siguiente: como envase del reactivo mencionado se utiliza un frasco pequeño, de unos 4 cm. de diámetro, de vidrio claro, y pintado en su mitad longitudinal de color negro para mejorar visibilidad de los humos originados en la reacción. Se toma en la mano izquierda el envase que contiene unos 10 cc. de reactivo, de tal manera que la banda negra longitudinal quede en sentido horizontal y debajo. Inmediatamente se toma con una asa de platino, previamente esterilizada al rojo en un mechero, de la superficie del medio de cultivo, un fragmento de la colonia para investigar. Se introduce la asa en el

frasco sin tocar la superficie del reactivo y poco después deberán observarse unas columnas de humo blanquecino (nubes de amoníaco), alrededor de la colonia bacilar sostenida por la asa de platino, en el caso de que ésta contenga el amoníaco.

En el cuadro N° 4 se demuestran los resultados que obtuvimos en la determinación de amoníaco de micobacterias aisladas de material procedente de humanos o animales, y de las cepas almacenadas en nuestra colección bacteriana, todas cultivadas o repicadas en el medio de Lowenstein Jensen con glicerina y sin ella.

El reactivo, una vez preparado, se utilizó durante varios meses, guardándolo en el frasco tapado con una tapa de cristal esmerilado. La eficacia del reactivo fue comprobada antes y después de las investigaciones, mediante pruebas adicionales realizadas con 2 cepas de cocos positivos para la prueba de amoníaco.

CUADRO N° 4

Resultados de determinación de amoníaco en diferentes micobacterias empleando el reactivo de Eber modificado por Ilukevich y Mora (1950).

Mycobacterium	N° de cepas investigadas	Positivas para amoníaco	%
M. tuberculosis	108	0	0
M. bovis	65	0	0
M. avium	5	0	0
Runyon I	7	0	0
Runyon II	14	0	0
Runyon III	9	0	0
Runyon IV	10	0	0
M. balnei (marinum)	4	0	0
M. phlei	2	0	0
M. smegmatis	2	0	0
M. fortuitum	2	0	0
Cocos NH ₃			
POSITIVOS (control)	2	2	100

Del cuadro N° 4 se desprende que ninguna de las cepas de micobacterias examinadas por nosotros ha producido amoníaco en cantidades apreciables por la reacción utilizada. Los resultados obtenidos en las investigaciones mencionadas permiten concluir que las micobacterias en general no producen el amoníaco libre en calidad de uno de los productos finales de su metabolismo en el medio de cultivo ensayado. Es posible que dicha particularidad es propia del género *Mycobacterium* y puede servir como aporte para su identificación "in vitro".

Reducción de telurito.

Kilburn y col. (1969), demostraron que algunas micobacterias tienen la capacidad de reducir el telurito de potasio incoloro a teluro metálico de color negro. La prueba mencionada puede ser empleada en la diferenciación complementaria de ciertas especies de micobacterias por el hecho de que el *M. avium* y la mayoría de las micobacterias agrupadas en el III y IV grupo de Runyon reducen el telurito, mientras que el *M. tuberculosis*, *M. bovis*, y las cepas fotocromógenas (Runyon I) y escotocromógenas (Runyon II) carecen de esta capacidad reductora.

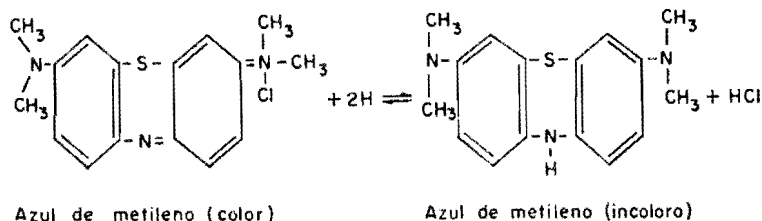
El procedimiento de la prueba de reducción de telurito es el siguiente:

Se siembra la cepa micobacteriana para investigar en el medio de Middlebrook líquido (7 H-9) enriquecido con ácido oleico, fracción V de albúmina bovina, catalasa y dextrosa. A los 7 días de incubación a los 37°C se anexan al cultivo dos gotas de una solución acuosa estéril de telurito de potasio al 2 por 100. Luego se devuelve el cultivo a la estufa y a los cuatro días de incubación se procede a la lectura de prueba. La aparición de un precipitado negro en el medio de cultivo indica la reducción de la sal de telurito a teluro metálico.

Reducción de azul de metileno.

Desbordes y Fournier (1950), encontraron que algunas micobacterias pueden reducir el azul de metileno anexado en ciertas proporciones al medio de cultivo. Según las investigaciones de Bönicke (1958), esta particularidad es característica para las micobacterias saprofíticas.

El azul de metileno actúa como receptor de hidrógeno y en la forma reducida pierde su color. La reacción es reversible ya que al pasar el oxígeno a través del medio que contiene el compuesto reducido, reaparece el color azul. La reacción mencionada puede ser representada en la forma siguiente:



El átomo de hidrógeno se fija reversiblemente en el doble enlace del nitrógeno y la sustancia de color azul pasa a la forma incolora o leucobase.

3. Bacteriostáticos tipo-específicos.

Se designa con el nombre de "bacteriostáticos tipo-específicos" aquellas drogas que pueden inhibir el desarrollo "in vitro" de un determinado tipo de los bacilos tuberculosos.

Roth, Carrara y Erlenmeyer (1953) dieron a conocer que la hidracida del ácido tiofen-carboxílico es fuertemente bacteriostática para el desarrollo de los bacilos tuberculosos bovinos de la cepa Valée, mientras que los bacilos de la cepa H₃₇Rv de procedencia humana no sufren alteraciones apreciables en los medios de cultivo con la droga mencionada. Posteriormente, Bönicke (1958-a), investigó la sensibilidad a la sustancia mencionada de

70 cepas de *M. tuberculosis*, 52 de *M. bovis*, y 35 cepas de otras micobacterias. El autor mencionado llegó a precisar que los bacilos tuberculosos humanos se desarrollan bien en presencia de 100 micras de la hidracida del ácido tiofen-carboxílico por cada c.c. del medio de cultivo, y que los del tipo bovino no se multiplican en los medios con 0,1 a 1,0 micras de la droga tipo-específica mencionada.

Resultados semejantes a los arriba expuestos ha obtenido Bönicke (1958-b) examinando otra hidracida carboxílica pentacíclica, precisamente, la hidracida del ácido furfuroil-2-carboxílico.

Pollak y Quiñones (1962), sometiendo a dichas pruebas 16 cepas de bacilos tuberculosos de tipo humano y 12 de tipo bovino, comprobaron los resultados obtenidos por Bönicke.

Por otra parte se sabe que las micobacterias que pertenecen a todos los 4 grupos de Runyon, incluyendo el *M. avium*, son resistentes (es decir, crecen en presencia de la droga en el medio de cultivo) a los siguientes tuberculostáticos: hidracida del ácido isonicotínico (Kubica, 1960); hidracida del ácido tiofeno 2 carboxílico (Bönicke, 1958-a); cloruro de neotetrazolio (Gastambide y Smith, 1958); estreptomina (Kubica y Dye, 1967); y rifampicina (McClatchy y col., 1969).

A continuación presentamos el cuadro N° 5 donde reunimos los resultados de las pruebas de resistencia a compuestos químicos (Centro Panamericano de Zoonosis, 1973).

CUADRO N° 5:

Susceptibilidad (-) o resistencia (+) de diferentes micobacterias a compuestos químicos.

Crecimiento en:	Especies			Grupos de Runyon			
	M. bovis	M. avium	M. tuberc.	I	II	III	IV
Hidráulica del ácido isonicotínico.	-	+	-	+	+	+	+
Hidráulica del ácido tiofeno-2 carboxílico	-	+	+	+	+	+	+
Neotetrazolio	-	+	-	+	+	+	+
Estrepto- micina	-	+	-	+	+	+	+
Rifampicina	-	+	-	+	+	+	+

Del cuadro N° 5 se desprende que la hidracida del ácido tiofeno-2 carboxílico se destaca como droga tipo-específica en cuanto a la diferenciación de los bacilos tuberculosos humanos (*M. tuberculosis*) de los bovinos (*M. bovis*).

DEMOSTRACION DE LA VIRULENCIA "IN VITRO"

1. Acordonamiento.

Maximow (1928), fue el primero en participar que los bacilos tuberculosos tienen la particularidad de crecer en ciertos medios de cultivo líquidos o en el fondo de tubos de ensayo con medios sólidos (en el agua de condensación) en forma de un sedimento compuesto de "hilos" o "cordones" de bacilos alineados paralelamente. Dicho acordonamiento de los bacilos acidorresistentes

puede ser observado microscópicamente bajo objetivo de inmersión, previa coloración de la preparación por el método de Ziehl-Neelsen.

Durante muchos años dicho fenómeno se quedaba sin explicación alguna hasta que Middlebrook y col. (1947) lograron observar que los bacilos virulentos se desarrollan en forma de cordones, mientras los avirulentos, salvo casos excepcionales, crecen de manera irregular.

Bloch y col. (1953), notificaron que la capacidad de formar dichos cordones depende parcialmente de la composición química de la superficie bacilar. Las micobacterias virulentas acusan la presencia de un factor específico extraíble con éter de petróleo. Dicho factor (cord factor) posee un efecto lítico sobre los leucocitos "in vitro" e "in vivo". Los bacilos tuberculosos privados del factor de acordonamiento mediante extracción del mismo, siguen desarrollándose en los medios de cultivo de manera irregular (sin formación de los cordones) y pierden su virulencia inicial para los animales susceptibles.

Kubica (1959), señala que la adición al medio de cultivo de ciertas cantidades de Tween 80 (agente de dispersión preparado a base de un éster de ácido oleico) altera la exacta interpretación de los resultados de la prueba, ya que en presencia de la sustancia mencionada, todas las micobacterias cultivables crecen sin formación de haces filamentosos o cordones.

Zapatero (1962) señala que la asociación del "factor cord" con la virulencia del germen no está bien establecida.

La opinión del Centro Panamericano de Zoonosis (Serie de Monografías Científicas y Técnicas - C.P.Z., N° 6, Buenos Aires, 1973, pág. 14) sobre el problema mencionado, textualmente, reza así: "Se dice que el fenómeno indica virulencia pero ocasionalmente cultivos no virulentos producen cordones".

Reacción de rojo neutro.

Dubos y Middlebrook (1948) dieron a conocer que existe una diferencia apreciable en cuanto a la adsorción del rojo neutro por

los bacilos acidorresistentes virulentos y no virulentos. Los autores mencionados atribuían el fenómeno en cuestión a la diferente composición bioquímica de la superficie bacilar correspondiente. Dicha observación indica que la superficie de los bacilos virulentos se destaca por compuestos más ácidos que la de los gérmenes no virulentos, hecho que facilita la unión del colorante con el bacilo virulento y determina la aparición de un color rojo en la suspensión bacilar alcalinizada. Nuestras investigaciones (Ilukevich, 1961) han demostrado que de las 68 cepas de bacilos de la tuberculosis humana patógenas para el acure, 67 resultaron positivas a la coloración mencionada (98,5%), y que de las 20 cepas no patógenas, solamente las 5 cepas (25%) respondieron positivamente a la prueba en cuestión. Dichos resultados son algo concordantes con los datos aportados por Xalabarder (1961), según los cuales el 92,5% de las 23 cepas de origen humano se colorean con el rojo neutro, y solamente el 41,2% de las 17 cepas de otros orígenes.

Dubos y Middlebrook (1948), proponen el uso de la siguiente técnica para la reacción del rojo neutro: Sobre varias colonias sacadas del medio de cultivo e introducidas con asa de platino en tubo de ensayo, se vierten 5 ml. de la solución acuosa de alcohol metílico al 50 por ciento. A continuación se incuba la suspensión durante una hora a la temperatura de 37°C, y al decantar el alcohol sobrenadante se procede a lavar el sedimento con otros 5 ml. de la solución alcohólica mencionada. Al centrifugar y decantar de nuevo el alcohol, se resuspende el sedimento (bacilos) en 5 ml. de la solución barbitúrica recién preparada (5 por ciento de cloruro de sodio más 1 por ciento de barbital sódico), y enseguida se añade 1 ml. de la solución acuosa de rojo neutro (20 miligramos del colorante por cada 100 ml. de agua destilada). A los 30 minutos se procede a la lectura. Los bacilos ácido resistentes virulentos adquieren un color rojo en el líquido que luce amarillo, mientras que las micobacterias no virulentas no cambian su color o se tornan ligeramente rosadas.

PARTICULARIDADES DEL CULTIVO DE LAS MICOBACTERIAS.

1. Cultivo en medios hísticos.

El patólogo alemán Paul von Baumgarten fue el primero que participó que había logrado la multiplicación de los bacilos tuberculosos en la cámara anterior del ojo de los conejos inoculados por vía oftálmica. Este decisivo descubrimiento apareció en la prensa el día 3 de Abril de 1882, es decir, con siete días de anticipación al célebre trabajo de Robert Koch, denominado "La etiología de la tuberculosis" que fue publicado el 10 de Abril del mismo año y en el cual Koch dio a conocer de haber cultivado, por primera vez, el bacilo que produce la tuberculosis, empleando medios de cultivo inanimados.

En aquella época se creía, y todavía lo creen muchos, que el mérito de las investigaciones de Baumgarten, junto con los de Cohnheim y Salomonsen, se limita al hecho de haber demostrado una vez más la contagiosidad de la tuberculosis, sin resaltar la trascendental importancia del humor acuoso como medio de cultivo para el fin correspondiente.

Moore (1942), y Fite y Olson (1944), lograron demostrar que los bacilos tuberculosos de los animales homotermos se permiten cultivar en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo vivo, con producción de efecto citopatológico característico en el tejido embrional. También otras micobacterias, tales como *M. phlei*, *M. fortuitum* y *M. smegmatis* se desarrollan en las envolturas del embrión de pollo y en el tejido del mismo, sin que las lesiones producidas permitieran la diferenciación de las especies bacterianas inoculadas.

Gay Prieto y col. (1965), inocularon material procedente de lesiones de diferentes tipos de lepra en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo de 12 días y encontraron ya a las 48 horas de la inoculación, lesiones nodulares macroscópicamente apreciables en la membrana mencionada. Investigación histológica de estas lesiones revelaba un granuloma caracterizado con la presencia de las células espumosas; su estudio con el microscopio electrónico permitía ver células vacuoladas con citolisomas y algunas formas globulares y cuerpos esféricos. La reinoculación de este material patológico de huevo a huevo permitía la reproducción de las lesiones en serie. El inóculo pasado por el filtro de Mendel producía lesiones macroscópicas y microscópicas similares a las obtenidas por inoculación directa del material

procedente de lepra humana. Una multiplicación de las micobacterias en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo no fue observada, sin embargo, los autores mencionados registraron la presencia de pequeños corpúsculos acidorresistentes, interpretados por ellos como variaciones morfológicas de las formas del *M. leprae*, quizás integrantes del ciclo "L".

Por otra parte se ha utilizado el cultivo de diferentes células "in vitro" como terreno para la multiplicación intracelular de las micobacterias. Así Suter (1952), demostró que los bacilos tuberculosos se multiplican en los macrófagos del acure; Chang (1961, 1962), dio a conocer sobre cierta proliferación del *M. lepraemurium* en los poliblastos (macrófagos) tomados de la cavidad intraperitoneal del ratón blanco y mantenidos por largo tiempo (hasta un año) en cultivos "in vitro"; y finalmente, Devignat (1961), Ranadive y col. (1962) y Chang (1965), han observado una limitada multiplicación del *M. leprae* en macrófagos humanos y ciertas células tumorales cultivadas artificialmente.

Gale y col. (1958, 1960), desarrollaron un método de cultivo precóz de micobacterias en la cavidad abdominal de ratones de experimentación, con el propósito de obtener un rápido reconocimiento de la tuberculosis. La prueba consiste en la inyección intraperitoneal del material sospechoso (esputos, contenido gástrico, etc.) mezclado con la cantidad de 0,5 ml. de una suspensión de mucina gástrica del cerdo al 5 por 100. En los casos positivos, los bacilos tuberculosos se desarrollan en gran cantidad en la cavidad abdominal del animal inoculado, hecho que puede ser comprobado microscópicamente ya a las dos o tres semanas de la inoculación. Según Gale el método de la preparación de la mucina es de gran importancia para la buena marcha de la prueba mencionada y debe ser realizado en la forma siguiente:

Se agrega la cantidad exacta de cinco gramos de la mucina granulada (type 1701-W de Wilson Laboratories-Chicago, Illinois) a 95 ml. de agua destilada y deja reposar de 5 a 10 minutos que, en general es el tiempo necesario para que el agua penetre en los gránulos de la mucina, y se mezcla bien en una mezcladora eléctrica con rápidos y cortos movimientos de la hélice (de 30 segundos a un minuto cada uno) para evitar el calentamiento de

la preparación, hasta que aparece una suspensión completamente homogeneizada. Luego se vierte la suspensión en un matraz de Erlenmeyer de un litro de capacidad, y se esteriliza en autoclave durante 15 minutos a 15 libras de presión. Se deja enfriar a la temperatura ambiente y se ajusta el pH de la suspensión a 7.0, utilizando para este fin la cantidad de unos 10 c.c. de la solución formal de hidróxido de sodio. Dicha suspensión debe ser utilizada en el día de su preparación.

Shepard (1961), obtiene una marcada multiplicación del *M. leprae* en los tejidos blandos de la planta podal del ratón blanco, mediante inoculación de muy pequeñas dosis bacilares (5 a 10 mil de bacilos por cada inóculo), sin embargo, no consigue la aparición de un cuadro clínico apreciable en dichos animales.

2. Cultivo en medios inanimados.

Koch (1882), cultivó por primera vez el bacilo de la tuberculosis empleando como terreno artificial el suero sanguíneo vacuno coagulado por el calor, después de múltiples ensayos infructuosos con otros medios. Igualmente obtuvo el desarrollo del bacilo mencionado en forma de velos en el suero líquido de bovino. No obstante, el crecimiento de los bacilos acidorresistentes en los medios mencionados fue muy escaso y no raras veces aparecía inhibido por la abundante contaminación de los cultivos correspondientes.

Numerosos descubrimientos posteriores hechos por diferentes investigadores contribuyeron al notable mejoramiento de las técnicas del cultivo, no obstante, algunas especies micobacterianas, entre ellas el *M. leprae*, *M. lepraemurium* y *M. bubalorum*, no se desarrollan con regularidad en medios artificiales y por lo tanto constituyen todavía un campo de exhaustiva investigación.

Las características más importantes de diferentes cultivos de micobacterias en medios inanimados las resumimos en la forma siguiente:

Hoy día se sabe que todas las micobacterias cultivables son aerobios, y que poseen la capacidad de utilizar amino-ácidos y

sales amónicas como reserva de nitrógeno y diversos compuestos de carbono como fuente de energía. Además del carbono, nitrógeno y oxígeno las micobacterias necesitan para su metabolismo elementos como hidrógeno, fósforo, potasio, magnesio y hierro. La adición de ciertos elementos pesados (cuyo peso específico es mayor de 4,5), en cantidades ínfimas al medio de cultivo, estimula el desarrollo bacilar; el mismo efecto produce azufre, sodio, citratos y otras sales de ácidos polivalentes.

La introducción por Dorset (1902), de un medio de cultivo elaborado a base de huevo coagulado marcó el rumbo hacia la preparación de los medios óptimos designados para el desarrollo artificial de los bacilos en cuestión. Al mismo tiempo Dorset ideó un medio sintético libre de proteína, los componentes del cual sirvieron posteriormente como punto de partida para numerosas modificaciones de la receta original. Surgieron diferentes medios de cultivo de alta especificidad selectiva, tales como el medio de Petroff (1915), Corper (1919), Lowenstein (1924), Hohn (1925), Petraghani (1926), Herrold (1931), Sasano y Medlar (1943), Corper y Cohn (1946), Yamane (1957), y otros que, en su composición llevan el huevo y varias otras sustancias empleadas por Dorset.

Lesslie (1970), e Ilukevich (1974), indican que el empleo de piruvato de sodio como ingrediente del medio de cultivo desarrollado por Stonebrink y col. (1969), favorece notablemente el desarrollo del *M. bovis*.

Parece que las micobacterias no necesitan vitaminas para su crecimiento, salvo pequeñas cantidades de biotina (ácido 2-ceto-3,4-imidazolido-2-tetra-hidro-iofeno-n-valeriánico) que forma parte del complejo vitamínico B y que se encuentra en la yema de huevo, leche, hígado y riñones. Dicha sustancia sirve como estimulante del crecimiento bacilar, hecho que puede explicar la importancia del Huevo como ingrediente de los medios de cultivo correspondientes.

Según Dubos (1958), el desarrollo de las micobacterias es más rápido y más exuberante si el pH del medio de cultivo se mantiene entre 6,0 y 8,0 con el óptimo para las cepas patógenas comprendido entre 6,5 y 6,8.

Nuestras experiencias han demostrado (Ilukevich, 1961) que el *M. tuberculosis* requiere en general, unos medios de cultivo cuyo pH oscila entre 7,4 y 7,8; mientras que el *M. bovis* se desarrolla mejor en terrenos ligeramente ácidos, es decir, con el pH de 5,8 a 6,8.

En cuanto a la glicerina (alcohol triatómico- $\text{CH}_2\text{OH}-\text{CHOH}-\text{CH}_2\text{OH}$) ésta puede ser considerada como un factor específico necesario para el desarrollo artificial de la mayoría de las especies de micobacterias, de *M. tuberculosis* y *M. avium*, especialmente. No obstante, ciertas micobacterias, tales como el *M. bovis* y *M. microti* son glicerínofobas y no se desarrollan bien o dejan de crecer por completo en terrenos glicerizados.

Nuestros experimentos realizados con 302 muestras de material patológico de procedencia bovina sembradas en el medio de Lowenstein-Jensen sin glicerina y con diferentes concentraciones de la misma, comprobaron una vez más la sensibilidad del *M. bovis* a la sustancia mencionada. Al final de la décima semana de incubación a la temperatura de 37°C hemos observado los siguientes resultados resumidos en el cuadro No 6.

CUADRO N° 6:

Resultados de los 302 cultivos de material de procedencia bovina en medios de Lowenstein-Jensen sin glicerina y con diferentes concentraciones de la misma.

Concentración de la glicerina en el medio de cultivo en %	Número de cultivos positivos para el <i>M. bovis</i>	%
SIN GLICERINA	113	37,4
0,75	103	34,1
2	82	27,2
5	52	17,2

Del cuadro N° 6 se desprende que de los cuatro medios de cultivo estudiados comparativamente, el de Lowenstein-Jensen sin glicerina resultó más eficaz para el aislamiento primario de

M. bovis y que el aumento de la concentración de la glicerina en el mismo, disminuye paulatinamente la sensibilidad y especificidad del medio para el bacilo tuberculoso bovino.

Según Merchant y Packer (1970), el 5 por 100 de glicerina, o más, inhibe el crecimiento de *M. muris* (*M. microti*) en lo que éste se parece al bacilo de la tuberculosis bovina.

Dubos y Davis (1946), señalan que trazos de los ácidos grasos de la cadena larga que se encuentran a menudo en los medios de cultivo, pueden frenar y hasta inhibir el desarrollo de las micobacterias en general y de los bacilos tuberculosos en particular. El efecto bacteriostático de estas sustancias puede ser anulado mediante anexo de ciertas cantidades de suero animal al medio de cultivo, o de fracciones de albúmina del suero.

Por otra parte, los lípidos complejos de la cadena cuya longitud se comprende de C-14 a C-18, estimulan notablemente el desarrollo de las micobacterias "in vitro". Dichas sustancias obran como elementos humidificantes que cubren los cuerpos bacilares e inhiben su apelmamiento en forma de gruesos sedimentos o velos flotantes y a la vez estimulan un crecimiento difuso y disperso en los medios de cultivo líquidos. El agente químico que Dubos propuso para la finalidad mencionada es conocido bajo el nombre de Tween-80 que es un compuesto sintético, no iónico, formado por ésteres de ácidos grasos de cadenas molecular larga y alcoholes polihídricos, es decir, un derivado polioxietilénico del monooleato de sorbitol.

Según Dubos y Middlebrook (1947), el Tween-80 contiene unas pequeñas cantidades de ácidos grasos no esterificados en calidad de impurezas tóxicas para el metabolismo normal de las micobacterias cultivables. Esta acción tóxica puede ser neutralizada, como lo hemos mencionado anteriormente, anejando pequeñas cantidades de suero sanguíneo animal o una fracción de sero-albúmina al terreno (V fracción de sero-albúmina bovina, por ejemplo).

Para el aislamiento primario de las micobacterias en general y de los bacilos tuberculosos en particular, Dubos (1952) re-

comienda el empleo de medios de cultivo enriquecidos con ácido oleico y sero-albúmina, o con ésteres del ácido oleico albúmina.

Tarshis y col. (1950, 1955), opinan que con buenos resultados puede emplear para el aislamiento primario de los bacilos tuberculosos, terrenos preparados a base de la **sangre** inactivada por el efecto de envejecimiento durante unos 8 a 12 meses, o más, y procedente de bancos de sangre, hospitales u otras instituciones semejantes, donde fue descartada por vencimiento de plazo de su utilidad. De la misma manera puede ser utilizada la sangre de animales domésticos, procedente de mataderos y envejecida debidamente.

Sin embargo, nuestras experiencias han demostrado que para el cultivo de bacilos tuberculosos bovinos es preferible utilizar la sangre de res, envejecida y elaborada del mismo modo que la sangre humana designada para el fin mencionado.

Más detalles sobre los métodos de laboratorio de micobacteriología veterinaria, para el aislamiento e identificación de bacilos tuberculosos bovinos, como también de otras micobacterias, el lector puede encontrar en la monografía científica elaborada por el Centro Panamericano de Zoonosis (1973).

Debemos mencionar que la introducción de nuevos métodos de descontaminación de la muestra mediante el empleo de diferentes sustancias químicas y antibióticos para atacar la flora asociada, como también el uso de poderosos mucolíticos y homogeneizantes, contribuyó mucho a la frecuente obtención de cultivos puros. Para los fines mencionados, Kubica y col. (1963), recomiendan la aplicación de N-acetil-cisteína en combinación con la solución de hidróxido de sodio al 4 por 100.

Tacquet (1967), emplea para la homogeneización y descontaminación de materiales para el aislamiento de micobacterias, soluciones de lauril sulfato de sodio e hidróxido de sodio, y el Centro Panamericano de Zoonosis (1972), destaca el valor del ácido oxálico al 5 por 100. No obstante, la Organización Panamericana de la Salud (1973), mantiene la opinión favorable en cuanto al uso de hidróxido de sodio al 4 por 100, concentración que puede elevarse al 6 por 100 para tratamiento de materiales muy contaminados.

En cuanto al cultivo del *M. paratuberculosis* (*M. johnei*), Twort (1910), logró aislar por primera vez el bacilo mencionado en medios artificiales, añadiendo bacilos tuberculosos muertos (esterilizados en autoclave) al terreno de proliferación. Posteriormente se vió que la tuberculina, como también los extractos de diversas micobacterias saprófitas, especialmente los preparados de *M. phlei*, contienen el ingrediente de crecimiento necesario para el desarrollo del bacilo de Johne "in vitro".

Francis y col. (1953), aislaron de *M. phlei* un extracto denominado Mycobactin, que anexado en ciertas cantidades a medios de cultivo aptos para el desarrollo de los bacilos tuberculosos, proporcionaba condiciones favorables para el crecimiento primario del *M. paratuberculosis* en estos terrenos. Los autores mencionados pudieron aislar el Mycobactin como un complejo cristalino de aluminio y también en forma amorfa libre de metal cuya fórmula empírica, probablemente, es $C_{47}H_{75}O_{10}N_5$.

García-Carrillo (1965), basado en sus experiencias de primeros aislamientos y cultivo de cepas colombianas de *M. paratuberculosis*, llega a la conclusión "que la parte más importante para el éxito del aislamiento inicial es el tratamiento de digestión de la muestra con tripsina o con pancreatina".

En Venezuela el *M. paratuberculosis* fue cultivado por primera vez por Ilukevich y col. (1970, 1971), a partir de la mucosa intestinal y heces fecales de bovinos afectados por la enfermedad de Johne en el Estado Zulia. Se utilizó el medio de Löwenstein Jensen con glicerina al 2 por 100, incorporándole además la tuberculina mamífera bruta (Old Koch Tuberculin) en proporción de 0,75 c.c. por cada 100 c.c. del medio referido. Los medios debidamente coagulados en tubos con rosca de baquelita fueron mantenidos (antes de sembrar) durante una semana en la estufa a los 37°C, con la tapa semiabierta, con el fin de obtener en los tubos un grado de humedad lo más bajo posible. La mucosa intestinal fue tratada con la solución de tripsina al 1 por 100, según la técnica descrita por Merkal y Larsen (1962). Para la decontaminación de los inóculos se utilizó la solución de hidróxido de sodio al 4 por 100 (heces) y la misma al 2 por 100 (mucosa). En ninguno de los casos se utilizó soluciones de Zephiran.

En la mayoría de los cultivos de las heces y de la mucosa intestinal correspondiente a las dos vacas estudiadas, aparecieron a las 4 a 7 semanas de incubación escasas colonias blanquecinas, deslustradas y bastante retardadas en su desarrollo disgónico. A las 12 semanas de incubación su diámetro raras veces era mayor de 4 milímetros; no obstante, al envejecer la colonia formaba una elevación central, se aumentaba un poco de tamaño, y se hacía de color amarillento. Los frotis teñidos por el método de Ziehl-Neelsen revelaron bacilos cortos y finos con el protoplasma heterogéneo. Los tamaños de los bacilos oscilaban entre 0,5 y 2,6 micras de longitud, con un promedio de 1,4 micras, fluctuando su diámetro entre 0,4 y 0,5 micras. La clasificación biológica y citotóxica los identificó como *M. paratuberculosis*.

En cuanto al aislamiento primario de las micobacterias no clasificadas, anónimas o atípicas, es decir, pertenecientes a los cuatro grupos de Runyon (1959), éstas se permiten cultivar en medios de cultivo aptos para el desarrollo de los bacilos tuberculosos.

Un problema no resuelto todavía constituye el aislamiento y cultivo "in vitro" del *M. leprae*. No obstante, Carpenter y Naylor (1959), al revisar la bibliografía de las décadas pasadas, señalan que numerosos bacteriólogos reportaron el haber cultivado "in vitro" una o varias bacterias a partir de pacientes leprosos. Entre los microorganismos descritos figuran bacterias difteroides, bacilos anaerobios esporulados y cepas de bacterias alcohol-ácidorresistentes. Los medios de cultivo más usados en dichas investigaciones fueron los terrenos aptos para el crecimiento de bacilos tuberculosos, sin embargo, en diferentes oportunidades se ensayó un gran número de medios de otra composición.

Souza Araujo (1950, 1959), logró demostrar que algunas cepas de bacilos ácidoresistentes aislados en cultivo a partir de lesiones leprosas humanas, son capaces de producir en ratones, ratas y macacos (Rhesus), lesiones de estructura lepromatosa, en el sitio de inoculación. El test de Mitsuda realizado con una suspensión de dichos bacilos fue siempre positivo en pacientes lepromatosos (al contrario de lo que sucede en la prueba de lepromina clásica) y por lo tanto no se mostraba apto para la

clasificación de la enfermedad, pero desempeñaba cierta acción de inmunidad.

Souza Araujo consideró que la inoculación repetida de los bacilos aislados por él, vivos o muertos por el calor, al principio causa fuertes reacciones locales y generalizadas, pero con el tiempo se hace notorio el efecto inmunológico positivo y curativo contra la lepra.

Soule y McKinley (1932), comunican sobre proliferación del supuesto *M. leprae* en un medio preparado a base de embriones de pollo e incubado en una atmósfera de oxígeno al 40 por 100 y de dióxido de carbono al 10 por 100. Los 42 especímenes ensayados proporcionaron en 25 oportunidades una limitada multiplicación de bacilos acidorresistentes no-cromógenos. Los intentos de subcultivar dichos bacilos en los medios de Petraghani o de Löwenstein-Jensen resultaron en todos los casos infructuosos.

Freire (1956), dio a conocer de haber cultivado el *M. leprae* en un medio compuesto de agar líquido al 0,1 por 100 mezclado con el medio sintético de Kirchner y con suero o plasma procedente de pacientes leproso. Freire menciona los 5 aislamientos de bacilos acidorresistentes verificados.

Nosotros (Ilukevich y Convit, 1966, Ilukevich, 1969, e Ilukevich y col., 1969) hemos sembrado en el medio de Löwenstein-Jensen un gran número de muestras procedentes de 310 pacientes con lesiones no abiertas, con el propósito de averiguar la frecuencia de cultivos positivos para micobacterias en los distintos grupos y tipos de la enfermedad. La incubación se efectuó a la temperatura de los 33°C durante 15 semanas consecutivas. En total hemos aislado 26 diferentes cepas de bacilos alcohol-ácido-resistentes, de los cuales las cepas catalogadas como no-fotocromógenas (pertenecientes al grupo III de Runyon) se revelaron como las de mayor poder patógeno, provocando nódulos bacilíferos de evolución lenta y progresiva en las orejas de hamsters (*Cricetus auratus*) y lesiones testiculares en ratas blancas. Según la prueba de desamidación específica de Bónicke, dichas cepas, incluyendo la cepa Zulia I, fermentan la nicotinamida y piracinamida solamente, es decir, se portan enzimáticamente como micobacterias afines a las aviarias, las que también pertenecen al grupo III de Runyon.

Las micobacterias afines a las aviarias, como se supone, son variedades del *M. avium*, tales como las cepas de Battey, *M. suis* y *M. ulcerans*, agentes infecciosos que producen diferentes enfermedades en el hombre y animales pero que semejan en su actividad enzimática mencionada y, además, pertenecen todas al grupo III de Runyon.

En investigaciones más recientes, Bönicke (1970), utilizó para el cultivo de *M. leprae*, tubos de ensayo en forma de dos cuernos, con separación de los extremos opuestos mediante una lámina perosa (filtro bacteriano) de cristal aglutinado. Ambas partes del tubo contenían el medio de cultivo líquido, una de las cuales servía para el desarrollo de la siembra, y la otra para la progresiva sustitución del medio durante el periodo de incubación. A los 9 a 12 meses se observó una multiplicación limitada del *M. leprae* en un 15,8 por 100 de los cultivos realizados. La temperatura óptima para el crecimiento fue de 32°C a 33°C, es decir, la misma observada por Ilukevich (1969).

Murohashi y Yoshida (1970), emplearon para los intentos de cultivar el *M. leprae*, un medio semisintético de agar blando al 0,1 por 100, de diversa composición básica. Después de 20 semanas a 1 año de incubación a la temperatura de los 37°C, en el medio mencionado se formaron micro-acúmulos de bacilos fuertemente ácido-resistentes. Lepromina preparada a base de estos bacilos indujo en los enfermos de lepra la misma reacción que el antígeno de Dharmendra.

Olitzki y col. (1965, 1967 a, 1967 b), lograron mantener "in vitro" durante ocho repiques subsiguientes, el supuesto *M. leprae* en un medio de Eagle enriquecido por el extracto de micobacterias saprófitas (medio de Olitzki-Gershon).

Hemos señalado anteriormente (Ilukevich y col. 1973) que hasta el momento no se han logrado crear condiciones experimentales favorables para que sean cumplidas las exigencias de Koch, relacionadas con la identificación del *M. leprae*. Por otra parte hemos sostenido la opinión que el polimorfismo del germen mencionado permite sospechar que el *M. leprae* posee un complejo ciclo de desarrollo, escalafonado en diversas etapas, a una de las cuales podrían pertenecer las micobacterias cultivadas "in

vitro" a partir de lepromas o de los ganglios linfáticos afectados, como la cepa "Zulia I" en particular.

Refiriéndose a estos bacilos cultivables "in vitro", Binford (1962), y posteriormente Convit y col. (1964), suponían que una nueva variante del *M. leprae* ha sido producida por mutación.

Delville (1974), y Pares (1974) sostienen la hipótesis de que existe un complejo ciclo de desarrollo de *M. leprae*. La regularidad de aislamiento de cepas de bacilos "difteroides" no ácidos resistentes a partir de ciertas lesiones leprosas confirma, según los autores mencionados, las capacidades adaptivas del agente infeccioso de la lepra.

No obstante, Pattyn (1974), considera que las cepas no ácidos resistentes (las "difteroides", por ejemplo) aisladas en los últimos diez años a partir de lepromas, no pueden ser identificadas como *M. leprae*, ya que son taxonómicamente diferentes. El autor mencionado expresa que el progreso hacia el cultivo de *M. leprae* puede ser hecho solamente como un resultado de aumento de conocimientos acerca de las actividades metabólicas de estos organismos "in vivo" e "in vitro".

Y por último, debemos mencionar que Olitzki (1974), opina que las dificultades que se presentan en el cultivo de *M. leprae* pueden obedecer a la excesiva presencia de inhibidores en el medio, así como a la carencia de sustancias promotoras de la multiplicación.

Ahora, en cuanto al cultivo artificial del *M. lepraemurium*, microorganismo que produce la lepra de las ratas (enfermedad de Stefansky), éste tampoco se desarrolla en los medios de cultivo designados para la multiplicación de otras micobacterias.

En los últimos años, Nakamura (1973 a, 1973 b, 1975) describe haber observado una multiplicación del *M. lepraemurium* en un medio líquido libre de células, el cual está enriquecido con el medio Kirchner más suero de cabra, ácido alfa-ketoglutarico, citocromo-C, hemín y l-cisteína. El crecimiento óptimo se obtuvo con el medio basal a pH 7,3 y después de las ocho semanas de incubación a los 30°C, utilizando un pequeño número de bacilos en la inoculación.

A continuación presentamos el cuadro N° 7 en el cual hemos reunido algunos datos sobre las condiciones de desarrollo y características de cultivo de diversas micobacterias en el medio de Löwenstein-Jensen original y enriquecido con sustancias como glicerina, piruvato sódico, Tween-80, Mycobactin y tuberculina.

CUADRO N° 7:

Factores que determinan el desarrollo de diferentes micobacterias en el medio de LOWENSTEIN-JENSEN.

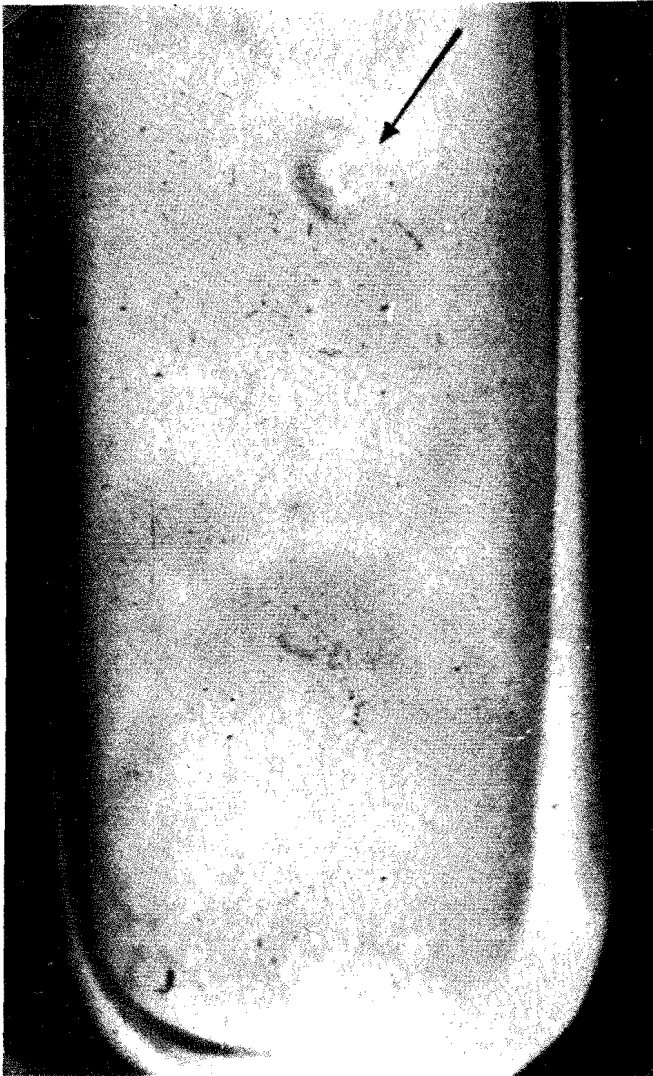
Mycobacterium	Sustancia	pH óptimo	Temp. óptima	Características del cultivo
<i>M. tuberculosis</i> (<i>M. hominis</i>) Zopf, 1883	Requiere glicerina 0,75% a 8,0%	7,6	37°C	Desarrollo EUGONICO: de 2 a 4 semanas de incubación aparecen colonias de aspecto seco, rugoso, de color gris amarillento, de consistencia frágil, con bordes planos y con elevación central en forma de escama o coliflor. Las colonias pueden alcanzar un tamaño prominente. No se homogeneizan en la prueba de Delgado Blanco e Ilukevich (1957). En casos excepcionales aparecen colonias de aspecto liso y de tamaño reducido.
<i>M. bovis</i> Bergey, 1934	No requiere glicerina; existen cepas glicerino-fobas. Requiere piruvato sódico: 4 mg./ml.	6,3	37°C	Desarrollo DISGONICO; después de 4 a 9 semanas de incubación aparecen colonias finas, lisas, lúcidas, sin pigmento y de aspecto húmedo. Su desarrollo es lento y su diámetro pocas veces es mayor de unos milímetros. Las colonias son bien adheridas al medio de cultivo y se homogeneizan fácilmente en la prueba de Delgado Blanco e Ilukevich (1957). En casos excepcionales aparecen colonias de aspecto seco, rugoso y de tamaño engrandecido.

Cont. Cuadro N° 7

Mycobacterium	Sustancia	pH óptimo	Temp. óptima	Características del cultivo
<i>M. avium</i> Chester, 1901	Requiere glicerina 0,75% a 8,0% Crece me- jor con Tween-80 0,1 %	7,2	39°C	Desarrollo EUGONICO ace- lerado: de 1 a 3 semanas de in- cubación aparecen colonias con- vexas, de aspecto lúcido, lisas, cremosas y de consistencia vis- cosa. Cuando son abundantes, pueden formar una capa superficial blan- da, húmeda y de color amarillen- to que con el tiempo se hace amarillo, rosado e incluso rojo tinto, si se incuban en presencia de la luz.
<i>M. muris</i> (<i>M. microti</i>) Smith, 1948	No requie- re gliceri- na, es glice- rinofobo.	7,2	37°C	Desarrollo DISGONICO: de 5 a 8 semanas de incubación apa- recen colonias finas de dos tipos: unas son redondas, lisas y con centro crateriforme; las otras son finamente granuladas y con bor- des estriados. Todas son de color blanco aperlado.
<i>Cepas foto- cromógenas</i> Runyon, 1959	Requieren glicerina 0,75% a 8%	7,2	37°C	De 2 a 4 semanas de incubación en oscuridad se desarrollan colonias sin pigmento. Al ex- poner estas colonias (jóvenes) a la luz del día y al volver de incu- barlas, muy pronto aparece una pigmentación cromógena (amarilla).
<i>Cepas esco- tocromógenas</i> Runyon, 1959	Crecen con glicerina y sin gli- cerina	7,2	37°C	Las colonias aparecen de 2 a 4 semanas de incubación y mues- tran una pigmentación amarilla, anaranjada o rojiza en obscuri- dad, es decir, sin necesidad de exponerlas a la luz.

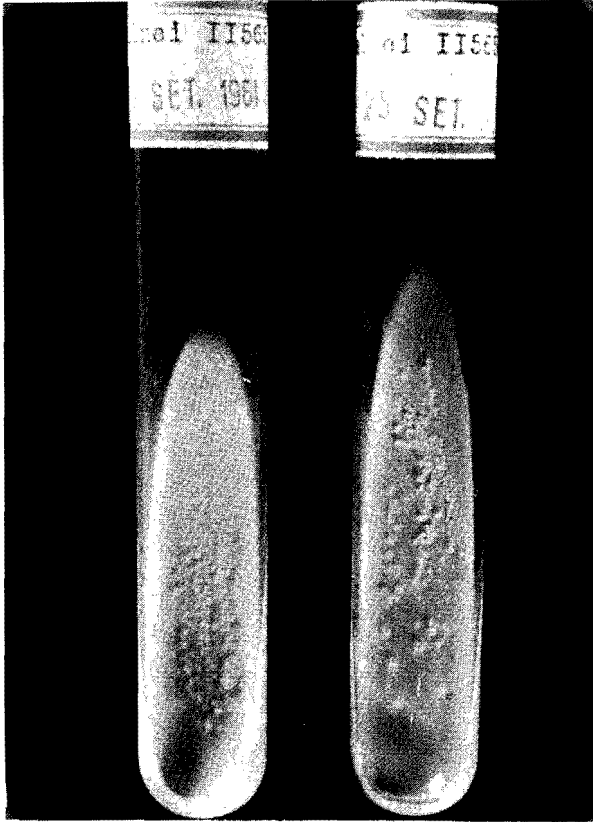
Mycobacterium	Sustancia	pH óptimo	Temp. óptima	Características del cultivo
<i>Cepas no-fotocromógenas</i> Runyon, 1959	Requieren glicerina 0,75% a 8 % Crecen mejor con Tween 80 0,1 %	7,2	37°C 31°C	De 2 a 5 semanas de incubación aparecen colonias lisas o rugosas (según la cepa) que al principio de su desarrollo no son pigmentadas. Al envejecer, muchas cepas empiezan a producir pigmento amarillento.
<i>Cepas de crecimiento rápido</i> Runyon, 1959	Algunas cepas son glicerino-filas, otras crecen con glicerina y sin ésta.	7,0	37°C	Las colonias aparecen después de pocos días de incubación, son de aspecto liso o rugoso, y generalmente cromógenas.
<i>M. paratuberculosis</i> (bacilo de Johne) Bergey, 1923	Requiere extracto de micobacterias (Micobactin) o Tuberculina, 0,75% Requiere glicerina 0,75% a 2 %	6,7	37°C	Desarrollo DISGONICO, muy lento; de 5 a 12 semanas de incubación aparecen colonias blanquecinas, deslustradas y planas que se desarrollan muy lentamente. Al envejecer dichas colonias forman una elevación central y se aumentan un poco de tamaño; luego se hacen blanco amarillentas. La elevación central se queda de color blanquecino opaca.
<i>M. marinum</i> (<i>M. balnei</i>) Aronson, 1926	Requiere glicerina 2 % aproximadamente.	7,2	31°C	De 3 a 5 semanas de incubación se desarrollan colonias lisas o finamente granulares, con borde irregular y de color amarillento. Cultivos viejos forman un pigmento amarillo hasta anaranjado, especialmente si se incuban en presencia de la luz. (Smith y Nocard, 1954)
<i>M. neoaurum</i> McCallum y col., 1948	Requiere glicerina 0,75% a 2 %	7,2	32°C	De 4 a 6 semanas de incubación aparecen colonias lisas de aspecto homogéneo, de color amarillento, tipo de amarillento. (McCallum y col., 1948)

Figura 21



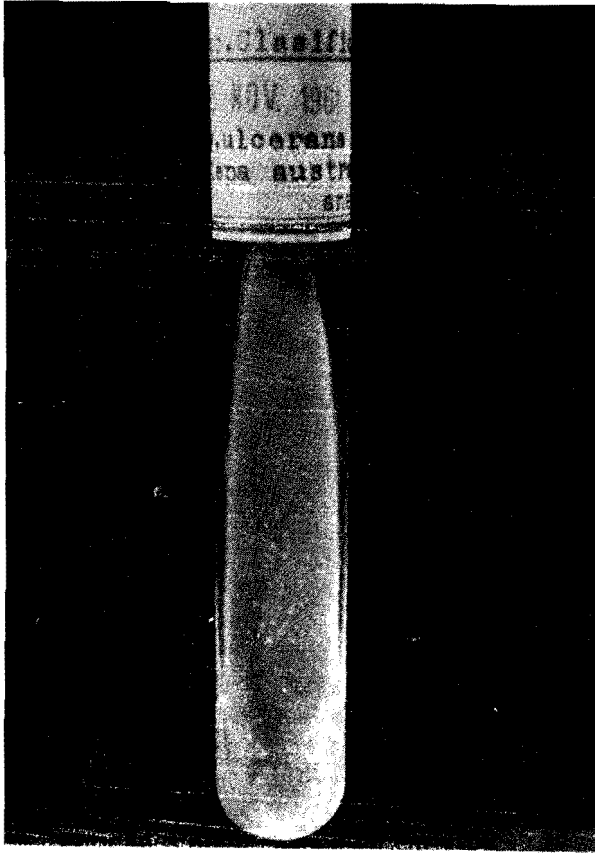
Colonia de *Mycobacterium paratuberculosis* sobre el medio de Löwenstein-Jensen con tuberculina, a las 24 semanas de incubación, de color gris amarillento, con bordes planos y elevación central característica. Cepa aislada por Ilukevich y col. (1970) a partir de la mucosa intestinal de una vaca de El Laral, Estado Zulia.

Figura 22



Subcultivo de *Mycobacterium balnei* (*Mycobacterium marinum*) en el medio de Lowenstein-Jensen a las 3 semanas de incubación. Colonias de aspecto liso, de color amarillento claro y con bordes irregulares.

Figura 23



Clasificación de las especies de la familia de las Ulceras de Lavenstein Jensen.
 Siglo de la clasificación de las especies de la familia de las Ulceras.

CARACTERISTICAS SEROLOGICAS DE LAS MICOBACTERIAS.

Pollak (1972), señala que la diferenciación entre el *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis* es casi imposible, mientras que el *Mycobacterium avium* posee un complejo antigénico diferente que permite su identificación mediante técnicas serológicas correspondientes.

Yugi y Nozake (1972), estudiaron la posibilidad del empleo de las pruebas de hemaglutinación pasiva (inclusive su modificación hemolítica), fijación del complemento y aglutinación-caolín, en el diagnóstico de la tuberculosis bovina. Según los autores mencionados el método de aglutinación-caolín resultó más seguro que los otros métodos ensayados para la detección de bovinos tuberculosos. La aglutinación no específica se mostró relacionada con la presencia de la fracción 198 del suero problema, la que pudo ser eliminada por absorción espesa de caolín (1mg./ml.) antes de efectuarse la prueba. Muy significativa fue la observación de que la tuberculinización de los bovinos infectados natural y artificialmente aumentaba la cantidad de los anticuerpos específicos presentes en el suero de estos animales antes de la tuberculinización.

Schaefer (1965), dio a conocer que las micobacterias atípicas, es decir, pertenecientes a los cuatro grupos de Runyon, se permiten identificar y clasificar por el método de aglutinación, señalando a la vez que, los antisueros específicos pueden ser preparados a partir de la sangre de conejos hiperinmunizados. La cantidad de los anticuerpos circulantes en la sangre de los animales mencionados, en general, alcanza niveles adecuados para la obtención de sueros sensibles específicamente.

El antígeno que se usa en dicha prueba es una suspensión estable de micobacterias desconocidas (muertas por fenol) en una solución salina isotónica tamponada a pH 7,0.

Según las recomendaciones del Centro Panamericano de Zoonosis (1973), el procedimiento de la prueba de aglutinación micobacteriana es la siguiente:

- a) Transfiera 0,5 ml. del antisuero apropiado a un tubo de vidrio.
- b) Añada 0,5 ml. de la suspensión de micobacterias al antisuero mencionado, y mezcle rotándolo suavemente.
- c) Incube la mezcla a 37°C por 3 horas.
- d) Observe la mezcla para hallar evidencia de la aglutinación de células y el aclaramiento del fluido en suspensión. Anote las observaciones usando el sistema numérico siguiente:

xxxx = Grandes acúmulos de células aglutinadas, el líquido sobrenadante aparece transparente.

xxx = Amontonamientos de tamaño medio de células aglutinadas, el fluido ligeramente opaco en suspensión.

xx = Pequeños amontonamientos de células aglutinadas, el fluido ligeramente opaco en suspensión.

x = Muy pequeños amontonamientos de células aglutinadas, el fluido opaco en suspensión.

0 = No hay células aglutinadas. El fluido en suspensión es opaco.

- e) Continúe la incubación por 15 horas más.
- f) Observe y haga anotaciones como se indica anteriormente en d.

El Centro Panamericano de Zoonosis indica los siguientes serotipos micobacterianos:

CUADRO N° 8:

Serotipos de las micobacterias (tomado de Centro Panamericano de Zoonosis, Serie de Monografías Científicas y Técnicas, N° 6, Buenos Aires, 1973, pág. 18)

Especies	Serotipos		
<i>M. bovis.</i>	No puede usarse la prueba de aglutinac.		
<i>M. tuberculosis</i>	No puede usarse la prueba de aglutinac.		
<i>M. avium</i>	Aviar 1; Aviar 2; Aviar 3.		
Grupo I de Runyon	<i>M. kansasii</i> ; <i>M. balnei</i> ; <i>M. marinum</i> .		
Grupo II de Runyon	<i>M. scrofulaceum</i> ; Cepa Gause; Cepa Lunning.		
Grupo III de Runyon	IIIa	IV	VI
	IIIb	V	VII
	Davis	Yandle	Darden
	Watson	Altman	Arnold
	Boone	Howell	Chance
	Wilson	Dent	
Grupo IV de Runyon	<i>M. fortuitum</i> I; <i>M. fortuitum</i> II		

En cuanto a la serología del *M. leprae*, todavía faltan datos concluyentes para su identificación y clasificación en la prueba mencionada.

Storrs y col. (1974), señalan que un 40 por 100 de armadillos (*Dasypus novemcinctus* y *Dasypus sabinicola*) capturados de la selva e inoculados por diferentes vías con suspensiones de *Mycobacterium leprae* de procedencia humana, desarrollaron lepra diseminada, la cual fue confirmada por examen histopatológico después de la necropsia. Los sobresalientes rasgos de la enfermedad incluyeron la presentación de enorme número de bacilos en el tejido lesionado del animal inoculado. Los autores mencionados calculan que de los armadillos muertos se obtuvieron 988 gramos de tejidos muy bacilíferos. Estos tejidos probable-

mente contienen de 15 a 20 g. de *Mycobacterium leprae*. La reserva de bacilos ahora está disponible para la investigación inmunológica y quimioterapéutica.

Sin embargo, debemos mencionar que en la bibliografía a nuestro alcance, casi no existen trabajos experimentales sobre el cultivo "in vitro" de los bacilos mencionados (procedentes del tejido de armadillo), tampoco hemos logrado leer algo sobre su patogenicidad y virulencia para la rata, ratón, y hamster, datos que podrían dilucidar mejor el carácter específico de estos microorganismos.

Y por último debemos mencionar que hemos examinado (Ilukevich, 1970, 1971a, 1971b) sueros sanguíneos de un total, de 21 enfermos de lepra, atendiendo su capacidad de aglutinación mediante el método de aglutinación rápida, con tres cepas de micobacterias (Antígenos I, II y III), cultivados a partir de lepromas humanas en Löwenstein-Jensen. Como comparación fueron examinados al mismo tiempo y con el mismo procedimiento otros 21 sueros sanguíneos de personas no leprosas (10 enfermos con tuberculosis pulmonar y 11 enfermos de la piel), además fueron aplicados otros tres antígenos (a, b y c); una cepa de *M. avium* y dos cepas cromógenas (Runyon II y III) aisladas a partir del esputo de enfermos de tuberculosis pulmonar.

Las reacciones de aglutinación mostraban que las micobacterias cultivadas a partir de tejido leproso provocaban aglutinación claramente positiva en 17 de 23 casos (en un caso reaccionaban las tres cepas, en 8 casos- 2, y en otros 8 casos, sólo reaccionaba uno de los antígenos).

Los restantes antígenos empleados como grupo control (*M. avium*, Runyon II y Runyon III) resultaban prácticamente inactivos.

En el grupo de enfermos no hansenianos podíamos observar reacciones de seroaglutinación positivas solo en 4 de un total de 21 casos examinados y solo con el antígeno III.

Podría suponerse que las cepas por nosotros estudiadas (I, II y III) presentan distintos tipos serológicos, solos o combi-

nados, pero que se encuentran relacionados biológicamente en los enfermos leprosos.

SUMARIO.

Se hace una revisión de las más importantes características bacteriológicas, bioquímicas y funcionales de diferentes especies micobacterianas, con especial énfasis a su identificación "in vitro".

Se analizan diferentes señas taxonómicas y se expone una propia clasificación de las micobacterias basada en los efectos patógenos que éstas producen en el hombre y animales.

Se describen diferentes métodos y técnicas de la coloración de las micobacterias, ilustrándolas con microfotos originales, en color, hechas a partir de preparaciones teñidas según Ehrlich, Ziehl-Neelsen, Quandt, Aubert, Steffen, Fite-Faraco y Gram. El autor señala que el método de la coloración acidorresistente fue ideado por Ehrlich ya en el año de 1882 y por lo tanto todas las modificaciones propuestas por otros autores en fechas posteriores, incluyendo la versión de Ziehl y Neelsen, podrían llevar el nombre de Ehrlich, porque en lo esencial no defieren del procedimiento inicial.

En cuanto a las experiencias propias, se hace saber que la aplicación combinada de los colorantes de Ziehl y Giemsa proporciona una excelente visualización de los bacilos acidorresistentes y de sus gránulos citoplasmáticos, ofreciendo a la vez una exacta diferenciación citológica del fondo de la preparación estudiada.

En el capítulo sobre la estructura microscópica, ultramicroscópica y funcional de las micobacterias, se da por cierto que la primera noticia sobre la existencia de corpúsculos microscópicamente apreciables en el citoplasma de los bacilos tuberculosos procede del mismo Koch (1882), quien los consideraba como esporos, y que las observaciones de Much (1907), Fontes (1910) y Lembke (1947), principalmente, lograron poner en duda dicha explicación de la apariencia perlada de las micobacterias.

Se describe las particularidades morfológicas de diferentes organelos de las micobacterias seccionadas con la cuchilla de FERNANDEZ MORAN para evidenciar su ultraestructura específica. Se llega a la conclusión, a base de las imágenes electrónicas aportadas, que las micobacterias aisladas a partir de lesiones lepromatosas humanas, se caracterizan de la misma manera como los bacilos de Koch, por la presencia de una sustancia densa que se vacuoliza fácilmente con el bombardeo electrónico.

Se supone que el acto de conjugación de las micobacterias, admitido últimamente por varios investigadores (Koelbel, 1970), proporciona una sólida base para el antiguo concepto de "polaridad sexual" bacteriana emitido por Hayes (1952) y sostenido por Xalabarder y Barnils (1962).

En el capítulo destinado a las particularidades bioquímicas de las micobacterias se discute sobre la síntesis de las vitaminas (complejos B y K), como también de las enzimas y coenzimas, en fin, de diferentes sustancias activas biológicamente que juegan un importante papel en la identificación y clasificación de los microorganismos correspondientes. Se aportan datos obtenidos en propias investigaciones como también tomadas de otros autores sobre el desdoblamiento de diferentes amidas por las amidasas micobacterianas, sobre la producción de amoníaco y sobre la acción casi patognomónica de los bacteriostáticos tipo-específicos.

A continuación se describen los fenómenos de acordonamiento y fijación de rojo neutro como métodos de demostración "in vitro" de la virulencia y patogenicidad de las micobacterias.

En cuanto a las particularidades del cultivo artificial de las micobacterias, el autor señala que el patólogo alemán Paul von Baumgarten fue el primero que participó de haber logrado el cultivo de los bacilos tuberculosos en la cámara anterior del ojo de conejo vivo, inoculado por vía oftálmica. Esta noticia apareció en prensa el 3 de Abril de 1882, es decir, con 7 días de anticipación al célebre trabajo de Robert Koch, en el cual el último dio a conocer de haber obtenido el cultivo puro de los bacilos mencionados en medios inanimados.

Luego se discuten sobre los medios de cultivo ideados posteriormente por diferentes autores para el aislamiento primario de las micobacterias y se resalta el indiscutible valor de los ingredientes propuestos por Dorset (1902), del huevo coagulado, especialmente.

En cuanto, al cultivo del *Mycobacterium bovis*, se indica que el piruvato de sodio favorece su desarrollo y que la glicerina lo inhibe notablemente.

Se presenta una breve exposición de las técnicas específicas del cultivo de *Mycobacterium paratuberculosis* y señala que el primer aislamiento y cultivo de dicho bacilo en Venezuela fué realizado por Ilukevich y colaboradores (1970) a partir de la mucosa intestinal y heces fecales de bovinos afectados por la enfermedad de Johne en el Estado Zulia.

Se hace una mención sobre los alcances en el campo de los estudios sobre el cultivo de *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepraemurium* y, por ende, se describen varios trabajos relacionados con el problema en cuestión, cuyos autores creen haber obtenido resultados prometedores.

Finalmente se analiza algunas características serológicas de las micobacterias y se expone la nómina de diferentes serotipos, incluyendo la de las micobacterias cultivadas a partir de pacientes leprosos, en Maracaibo.

SUMMARY.

SOME CHARACTERISTICS OF PATHOGENIC MYCOBACTERIA FOR MAN AND ANIMALS.

This paper is a review of the most important bacteriological, biochemical and physiological characteristics of Mycobacteria species, making special emphasis on its "in vitro" identification.

Several Mycobacteria taxonomical traits are analyzed, and a classification of the Mycobacteria, based on their effects on man and animals is presented. Different methods and techniques for

staining Mycobacteria are described. This description is illustrated with color microphotographies made from smears stained according to the techniques of Ehrlich, Ziehl-Neelsen, Quandt, Aubert, Steffen, Fite and Gram.

The author points out that the acid-fast staining procedure was created by Ehrlich in the year of 1882 and therefore, all modifications proposed by other researchers in more recent date, including the Ziehl-Neelsen version, might be named according to Ehrlich, because they do not differ from the technique proposed by the latter.

Regarding to his own experiences, the author indicates that the combined application of the Ziehl and Giemsa dyes, provide an excellent visualization of the acid-fast rods and their cytoplasmic granules. It provides an outstanding citological differentiation of the background of the stained smear.

In the chapter on microscopic, ultramicroscopic, and physiological structure of the Mycobacteria it is accepted that the first notice on the presence of microscopic bodies in the cytoplasm of the tubercle bacilli was given by Koch (1882) who thought of them as spores. After that, research conducted by Much (1907), Fontes (1910) and Lembke (1947) explained the appearance of the Mycobacteria.

Morphological characteristics of several inclusion bodies, cut by using the Fernandez Moran diamond knife to demonstrate their specific structure, are presented.

The author concludes, from the electronic images, that the Mycobacteria isolated from human lepromatous lesions, contain a dense substance, as the tubercle bacillus, which is easily visualized using electronic bombing.

It is stated in this paper, that the conjugation of Mycobacteria, which has been accepted nowadays by several investigators, is a solid for the ancient concept of "sexual polarity" created by Hayes (1952) and held by Xalabarder and Barnils (1962).

In the chapter on biochemical characteristics of the *Mycobacteria*, the synthesis of the biological substances that play an important roll in the classification and identification of the species, is analyzed. Synthesis of Complex B and K vitamins, enzymes and coenzymes is specially discussed. Data from the current literature and from the author's own investigation about the brakdown of different amides by the action of *Mycobacterial* enzymes, the ammonium production, and the almost pathog-nomonic action of the type-specific bacteriostatics, is included.

Properties of "cord formation" and neutral red fixation are discussed as tests "in vitro" for demostrating the virulence and pathogenicity of the *Mycobacteria*.

Regarding the characteristics of the tissue culture of *Mycobacteria* it is pointed out that Paul Baumgarten (1882), a ger-man pathologist, was the first investigator who succeeded in culturing the tubercle bacillus in the rabbit eye chamber. Moreover, a discussion about different culture media for the primary isolation of the *Mycobacteria*, and the excellent value of the ingredients proposed by Dorset (1902), is presented. In relation to the culture of *Mycobacterium bovis*, it is indicated that the sodium pyruvate is a growth enhancing factor while glycerine is an inhibiting factor.

A brief description of the spedific technique for the culture of *Mycobacterium paratuberculosis*, as well as the notice that the first culture and isolation of *M. paratuberculosis* in Venezuela was accomplished by Ilukevich et al. (1970), is included. The author indicates that they used intestinal mucous and fecal material from diseased bovine in the State of Zulia as their source for isolating *M. paratuberculosis*.

The scope of the research on the culture of *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium lepraemurium* is also discussed. The author describes several papers related to the subject.

Finally, a review of some serological characteristics of the *Mycobacteria* is presented. A list of different serotypes, including the *Mycobacteria* cultured in the city of Maracaibo, from leprous patients is annexed.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. ALMQUIST, H.J., and KLOSE, A.A. (1939). The antihemorrhagic activity of pure synthetic phthiocol. J. Am. Chem. Soc., 61: 1611-1612.
2. ANDERSON, R.J., and NEWMAN, M.S. (1933). J. Biol. Chem., 103: 197-200 y 101: 773-776; referido según ROJAN, C.A. (1946): Productos químicos y farmacéuticos. Ed. ATLANTE, S.A., México, D.F. (II tomo, pag. 1356).
3. AUBERT, E. (1950). "Cold" stain for acid-fast bacteria. Canad. J. Pub. Health, 41: 31-32.
4. BAUMGARTEN, von, P. (1882, 3 de Abril). Der Erreger der Tuberculose. Centralblatt medizinischer Wissenschaften, 20: 257 y 337.
5. BEAVEN, P.W., and BAYNE, J.S. (1931). Mycobacterium Ryan Strain isolated from pleural exudate. J. Infect. Dis., 49: 399-401.
6. BERGEY' s Manual of Determinative Bacteriology. 7^o ed., Williams and Wilkins Co., Baltimore (U.S.A.), 1957, págs 694-707.
7. BINFORD, C.H. (1962). Studies on a Mycobacterium obtained from the golden hamster (*Cricetus auratus*) after inoculation with lepromatous tissue. Labor. Investig., 11: 942-955.
8. BLOCH, H., NOLL, H., and ASSELINEAU, J. (1953). A toxic lipid component of the tubercle bacillus (Cord Factor). 1^o -Isolation from petroleum ether extracts of young bacterial cultures. Am. Rev. Tuberc., 67: 629-631. 2^o -Ocurrence in cloroform extracts of young and older bacterial cultures. Am. Rev. Tuberc., 67: 828-829. 3^o - Ocurrence and Distribution in various bacterial extracts. Am. Rev. Tuberc., 67: 853.
9. BONICKE, R. (1957). Die Bildung von Niacin durch Mycobakterien. Jahresbericht Borstel (Alemania), 1: 137-143.
10. BONICKE, R. (1958). The classification of mycobacteria with the help of different chemical tests. Bull. Tuberc., 28: 162-164.
11. BONICKE, R. (1958a). Über die tuberkulostatische Wirksamkeit penta-heterocyclischer Carbonsaurehydrazide. Zschr. Hyg., 145: 263-264.
12. BONICKE, R. (1958b). Die Differenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien mit Hilfe von Thiophen-2-carbonsaurehydrazid. Naturwissenschaften, 45: 392-394.
13. BONICKE, R. (1961). Die Bedeutung der Acylamidase für die Identifizierung und Differenzierung der verschiedenen Arten von der Gattung Mycobacterium. Jahresbericht Borstel (Alemania), 5: 7-87.
14. BONICKE, R. und EWOLDT, A. (1965). Quantitative Untersuchungen über das Niacin-Bildungsvermögen von *M. borstelense* var. niacinogenes. Beitr. Klin. Tuberk., 130: 149-152.
15. BONICKE, R. (1970). The present state of growth of *M. leprae* under in vitro conditions. Summaries Internat. Leprosy Coll. (Borstel, Alemania, August 26 to 27), 1: 29-30.

16. BRADFIELD, J.R.G. (1956). Organization of bacterial cytoplasm. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 6: 296-317.
17. BURROWS, W. (1969). Tratado de Microbiología. Editorial Interamericana, 19^o ed. (en español), México (pág. 67).
18. CALMETTE, A. (1928). L' Infection bacillaire et la Tuberculose chez l' homme et chez les animaux. Masson et Cie Ed., Paris.
19. CARPENTER, C.M., and NAYLOR-FOOTE, A. W.C. (1959), en COCHRANE, R. G. (1959) - Leprosy in Teory and Practice. John Wright and Sons LTD, Bristol, pga 7-21.
20. CASTAÑE-DECOUD, A. (1972). Ultraestructura del bacilo de Hansen. Rev. Microscop. Electrón., 1: (N^o 1), 34-35.
21. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, (1972). Diagnosis de laboratorio de la tuberculosis animal. Ed. Ramos Mejía, Centro Panamericano de Zoonosis (N.T. 16), Argentina.
22. CENTRO PANAMERICANO DE ZOONOSIS, (1973). Métodos de laboratorio de micobacteriología veterinaria para el aislamiento e identificación de micobacterias. Serie de Monografías Científicas y Técnicas, Ed., C.P.Z. Ramos Mejía, Argentina (N^o 6, pag. 1-48).
23. COMITE DE EXPERTOS DE LA OMS EN TUBERCULOSIS, (1974). IX Informe. Ed. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
24. CONVIT, J. e ILUKEVICH, A. (1966). La posibilidad vital en el hamster de bacilos inoculados provenientes de formas Borderline y Lepromatosa. Segunda Reun. Anual de Dermatol, Hosp. Vargas de Caracas, Resúmenes, 2: 8-9.
25. CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., e IMAEDA, T. (1962). Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. I-Clinical, Bacteriologic and Histopathologic study. Internat. J. Leprosy, 30:239-253.
26. CONVIT, J., LAPENTA, P., ILUKEVICH, A., and IMAEDA, T. (1964). Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. III- Internat. J. Leprosy, 32: 136-149.
27. CORPER, H. J. (1919). The cultivation of recently isolated and laboratory strains of human tubercle bacilli on artificial media. Am. Rev. Tuberc., 3:461-463.
28. CORPER, H.J., and COHN, M.L. (1946). Combination egg media for the diagnostic culture of tubercle bacilli. Am. Rev. Tuberc., 53:575-582.
29. CORPER, H.J., and SWANY, H.C. (1918) -J. Bact., 3:129-131; referido según VIRTANEN, S. (1960). A study of nitrite reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc. Scand. Supplement XLVIII.
30. CHANG, Y T. (1961). The mouse macrophage as host cell for *Mycobacterium lepraemurium*. Tranc. Leonard Wood Memorial John Hopkins University Symposium on Research in Leprosy, Doull, J. A. editor, Leonard Wood Memorial, Washington. D.C. (pág. 118-125).

31. CHANG, Y. T. (1962). Growth of *Mycobacterium lepraemurium* in cultures of mouse macrophages. VIII Internat. Congr. Microbiology, Abstract, Montreal, Canada (pag. 122).
32. CHANG, Y.T. (1965). Comunicación personal.
33. CHAPMAN, G.B., HANKS, J.H., and WALLACE, J. H. (1959). An electron microscope study of the disposition and fine structure of *M. lepraemurium* in mouse spleen. J. Bacteriol., 77: 205-211.
34. DELGADO BLANCO, J. e ILUKEVICH, A. (1957). Contribución al estudio de la variedad bovina del *Mycobacterium tuberculosis* en el hombre en Venezuela. Rev. Policlin. Caracas, N° 143:145-164.
35. DELGADO BLANCO, J. e ILUKEVICH, A. (1957). Estudio sobre una cepa de *Mycobacterium tuberculosis*, var. *bovis de procedencia humana*. Boletín de Hosp. (Caracas), 56:59-69.
36. DELVILLE, M. J. (1974). Relations entre *M. leprae* et les bacilles "diph-térides" isolés chez les lépreux. Acta Lepr. N° 55-56, pág. 45-49.
37. DESBORDES, J. and FOURNIER, E. (1950) -Ann. Inst. Pasteur, 79:210; referido según VIRTANEN, S. (1960). Study of nitrite reduction by mycobacteria. Test in the identification of mycobacteria. Acta Tuberc. Scand., Supplement, XLVIII.
38. DEVIGNAT, R. (1961). Multiplication of Hansens bacillus in complex symbiosis "in vitro". Nature, 190:832-834.
39. DIVO, A. (1971). Microbiología médica. 2º Ed. Interamericana, México (pág. 201).
40. DORSET, J. (1902) -Am. Med., 3: 555-559; referido según ROLLE, M., (1949). Mikrobiologie und allgemeine Seuchenlehre, Enke Verlag, Stuttgart (pág. 136 y 183).
41. DUBOS, R. J. (1958). Bacterial and mycotic infections of man. Third Edition; Lippincott Co., Philadelphia-Montreal.
42. DUBOS, R.J., and DAVIS, B. D. (1946). Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media. J. Exp. Med., 83: 409-423.
43. DUBOS, R.J., and MIDDLEBROOK, G. (1947). Media for tubercle bacilli. Amer. Rev. Tuberc., 56: 334-335.
44. EHRLICH, P. (1882). Nota previa (Vorlaufige Mitteilung). Dtsche Med. Wschr., 8:269-271.
45. FEHTKE, N., and ANDERSON, R. J. (1948) -Amer. Rev. Tbc., 57:294-296; referido según HEIN, J. KLEINSCHMIDT, H. und UHELINGER, E. (1958), Handbuch der Tuberkulose. Band I, G. Thieme Ver., Stuttgart (pág. 148).
46. FELDMAN, W.H., DAVIES, R., MOSES, H. W., and ANDBERG, W. (1943). An unusual mycobacterium isolated from of a man suffering from pulmonary disease of long duration. Amer. Rev. Tuberc., 48:82-85.
47. FERREIRA, E., ILUKEVICH, A., BARROSO, C., y FERNANDEZ, R. (1971). Anatomía patológica de ratas blancas inoculadas por vía intratesticular con diversas micobacterias. Resúmenes del VIII Congreso Latinoa-

- mericano de Anatomía Patológica, Maracaibo, 5 al 10 de Dic. de 1971 (pág. 43).
48. FITE, G.L., and OLSON, A. (1944) - U.S. Publ. Health Rpts, 59:1423; referido según HAGAN, W.A., BRUNER, D.W. y GILLESPIE, H. J. (1970). Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 3º edic. española. La Prensa Médica Mexicana, México, D. F. (pág. 384).
 49. FITE, G.L., CAMBRE, P.J., and TURNER, M.J. (1947). Procedure for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. Arch. Path., 43: 624-626.
 50. FELDMAN, R.A. (1974). Primary mycobacterial skin infection: a summary. Internat. J. Dermatol., 13: 352-356.
 51. FONTES, A. (1910). Comentarios sobre la infección tuberculosa y su virus. Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, 2: 141-186.
 52. FRANCIS, J., MACTURK, H. M., MADINAVEITIA, J., and SNOW, G.A. (1953). Mycobactin a growth factor for *Mycobacterium johnei*. I - Isolation from *Mycobacterium phlei*. Biochem. J., 55: 596-607.
 53. FREIRE, S.A. (1956). Methods of cultivation of the Hansen bacillus. Slide culture; Hemolysis tube culture; Direct inoculation of the liquid medium. Internat. J. Leprosy, 24: 57-59.
 54. GALE, D., and LOCKHART, E.A. (1960). A rapid mouse test for the diagnosis of tuberculosis. Am. Rev. Tuberc. 81: 715-725.
 55. GALE, D., VESTY, G., and JACK, A. (1958). A rapid mouse test for the diagnosis of pulmonary tuberculosis. Am. Rev. Tuberc., 77: 1005 y 1012.
 56. GARCIA CARILLO, C. (1965). Primeros aislamientos y cultivo de cepas colombianas de *Mycobacterium paratuberculosis*. El Veterinario (Colombia), Nov. -Dic., pág. 9-10 y 29.
 57. GASTAMBIDE-ODIER, M., and SMITH, D. W. (1958). A rapid means of differentiating atypical acid-fast bacilli and avian tubercle bacilli from other mycobacteria. The neotetrazolium inhibition test. Amer. Rev. Tuberc., 77: 662-668.
 58. GAY PRIETO, J., RUBIO HUERTOS, M. and ALONSO PUERTAS, M.L. (1965). Experiments on the transmission of human leprosy to the chorio-allantoic membrane of the chicken. Acta Leprolog., (Nº 23) : 5-7.
 59. GUNSALUS, I.C., and STEINER, R. Y. (1961). The Bacteria. Acad. Press. New York, II Tomo (pág. 365).
 60. HAGEMANN y HERMAN (1955), referido según MERCK, E. (1955). Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden. Ver. Chemie-Weinheim (Alemania), 8º Aufl. (pág. 213).
 61. HAYES, W. (1952) - Nature, 169: 118-120; referido según XALABAR- DER, C. y BARNILS, M.L. (1962). La genética bacteriana vista con el microscopio electrónico. Publ. Inst. Antituberc. "Francisco Moragas", Barcelona, Suplemento 3.
 62. HERROLD, R.D. (1931). Egg Yolk agar medium for growth of tubercle bacilli. J. Infec. Dis., 48: 236-238.
 63. HOHN, J. (1926). Die Kultur des Tuberkelbacillus zur Diagnose der Tuberkulose. Münch. Med. Wschr., 32: 609-611.

64. HOLLANDE, G. (1962)- Arch. Protistenk., 106: 101-108; referido según XALABARDER, C. y BARNILS., M.L. (1962). La genética bacteriana vista con el microscopio electrónico. Publ. Inst. Antituberc. "Francisco Moragas" Barcelona, Supl. 3.
65. ILUKEVICH, A. (1961). Particularidades bacteriológicas de las micobacterias patógenas para el hombre y animales domésticos. II Congreso Venezolano de Salud Públ., Caracas, 25 de Febr. al 3 de Marzo. Monografía (34 pág.).
66. ILUKEVICH, A. (1969). Sobre el aislamiento de micobacterias a partir de pacientes leprosos. Particularidades bacteriológicas y el poder patógeno de las cepas cultivadas en medios artificiales. Ksmera, 3: 111-139.
67. ILUKEVICH, A. (1970). Características antigénicas de algunas cepas de micobacterias cultivadas, procedentes de tejidos leprosos. Pruebas de aglutinación. Rev. de Leprología Fontilles, España, 7: 551-556.
68. ILUKEVICH, A. (1971a). Antigenic properties of some mycobacterial strains isolated and cultivated from leprosy tissue. Internat. J. Leprosy, 39: 581-584.
69. ILUKEVICH, A. (1971b). Ensayos de seroaglutinación con micobacterias cultivadas de pacientes hansenianos y llevadas en pases por animales de laboratorio. Memorias del VIII Congreso Venezolano de Ciencias Médicas (Maracaibo). Edic. Acad. Nac. de Medicina, 1: 585-591.
70. ILUKEVICH, A. (1974). Estudio experimental sobre el diagnóstico de la tuberculosis bovina mediante pruebas de cultivo e inoculación animal. Cienc. Veterin. (Maracaibo), 4: 137-200.
71. ILUKEVICH, A. BARROSO, C., y HOMEZ, J. (1969). Cultivo e inoculación experimental de una micobacteria aislada de un caso de lepra lepromatosa reaccional. V Reunión Anual de Dermatología, Hogar-Clínica, Maracaibo, 19-24 de Junio.
72. ILUKEVICH, A., CONVIT, J., IMAEDA, T. y LAPENTA, P. (1964). Comentarios sobre la situación de las micobacterias en la sistemática actual. Rev. Ven. San. Asist. Soc., 29: 98-110.
73. ILUKEVICH, A., FERREIRA, E., BARROSO, C. y FERNANDEZ, R. (1973). Consideraciones sobre la etiología de la enfermedad de Hansen. Rev. de Leprología Fontilles, España, 9: 9-31. Ksmera (Maracaibo), 4: 237-256.
74. ILUKEVICH, A., FERREIRA, E., BELTRAN, W. y HERNANDEZ, O. (1971). Detección del primer foco de la paratuberculosis bovina en el Estado Zulia. Estudio clínico, anatomo-patológico y bacteriológico. Rev. Vet. Venezol., 30: 209-228.
75. ILUKEVICH, A., HERNANDEZ, O. y BELTRAN, W. (1970). Paratuberculosis bovina en el Estado Zulia. Estudio bacteriológico. IV Jornadas Venezol. de Microbiología, Maracaibo, 10 a 13 de Junio (Monografía).
76. ILUKEVICH, A. y CONVIT, J. (1966). El cultivo de micobacterias a partir de pacientes leprosos. Reunión Anual de Dermatología, Hospital Univers., Caracas, 24 a 25 de Junio.

77. ILUKEVICH, A. y MORA, R. (1950). Modificación del método de Eber para la determinación de amoniaco. *El Agricultor Ven.*, 15: 16-19.
78. ILUKEVICH, A. y TRUJILLO, R. (1968). Contribución al estudio de las micobacterias atípicas; infecciones humanas y bovinas. *Rev. Vet. Venezol.*, 25: 385-402.
79. ILUKEVICH, A. y TRUJILLO, R. (1966). La tuberculosis y algunas otras micobacteriosis de los animales domésticos en Venezuela. Estudio bacteriológico. *Memorias 5º Congreso Panam. de Med. Veterinaria, Caracas*, 2: 636-643.
80. ILUKEVICH, A. y VALERO MARTINEZ, J.A. (1960). Estudio bacteriológico sobre los dos primeros casos de infecciones por el "Yellowbacillus" (micobacterias atípicas) en Venezuela. *Rev. Tisiolog. y Neumonolog. (Caracas)*, 2: 3-23.
81. Ilukevich, A., Soto, y., Vargas, H., Manzanilla, S. y Connell, A. (1974). Virulencia y patogenicidad para diferentes animales de laboratorio de dos cepas del género *Nocardia* de procedencia humana. *Proceedings First Internat. Conference on the Biology on the Nocardiae (Mérida, Venezuela)*, McGowen Printing Co., Augusta, Georgia, U.S.A., 1: 104-105.
82. IMAEDA, T. (1963). Estudio bacteriológico y patológico de la lepra con el microscopio electrónico. *Acta Cient. Venezolana, Supl.*, 1: 184-193.
83. IMAEDA, T., and CONVIT, J. (1962). Electron microscope study of *Mycobacterium leprae* and its environment in a vesicular leprous lesion. *J. Bacteriol.*, 83: 43-52.
84. IMAEDA, T., and OGURA, M. (1963). Formation intracytoplasmatic membrane system of Mycobacteria related to cell division. *J. Bacteriol.*, 85: 150-163.
85. IMAEDA, T., CONVIT, J., ILUKEVICH, A., and LAPENTA, P. (1962). Experimental inoculation of human leprosy in laboratory animals. II - Electron microscope study. *Internat. J. Leprosy*, 30: 395-413.
86. KILBURN, J.O., SILCOX, V.A., and KUBICA, G.P. (1969). Differential identification of mycobacteria. V - The tellurite reduction test. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 99: 94-100.
87. KOCH, R. (1882, 10 de Abril). Die Aetiologie der Tuberkulose. *Berlin. Klin. Wschr.*, 19 (Nº 15): 1-5.
88. KOELBEL, H. (1970). Das Substrat der Variabilitaet von Mycobakterien im elektronen-mikroskopischen Bild. *Springer Ver. Pneumonology*, 142: 83-107.
89. KOENIG, W. (1904) - *J. Pract. Chem.*, 69: 105-108; referido según MEDVECZKY, E. (1960). A micromethod for the routine differentiation of human tubercle bacilli from other mycobacteria in primary cultures. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 81: 757-758.
90. KOIKE, M., and TAKEYA, K. (1961). Fine structures of intracytoplasmic organelles of mycobacteria. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9: 507-608.
91. KONNO, K. (1956). New chemical method to differentiate humantype tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science*, 124: 958-961.

92. KONNO, K. (1958). The metabolism of nicotinic acid of acidfast bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 77: 669-670.
93. KONNO, K., KURZMAN, R., and BIRD, K.T. (1957). The metabolism of nicotinic acid in mycobacteria. *Am. Rev. Tuberc.*, 75: 529-533.
94. KONNO, K., KURZMAN, R., BIRD, K.T., and SBARRA, A. (1958). Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. I — Niacin production of human tubercle bacilli and acid-fast bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 77: 671-674.
95. KUBICA, G.P. (1960). Tuberculosis. Laboratory methods in diagnosis. Ed. Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia.
96. KUBICA, G.P., and DYE, W.E. (1967). Laboratory methods for clinical and public health mycobacteriology. Department of Health, Education and Welfare (Publication N° 1547), Washington, D.C., U.S.A.
97. KUBICA, G.P., DYE, W.E., COHN, M.L., and MIDDLEBROOK, G. (1963). Sputum digestion with N-acetyl-L-Cysteine-Sodium Hydroxide for culture of Mycobacteria. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 87: 775-777.
98. LAMANNA, C. (1946). The nature of the acid-fast stain. *J. Bact.*, 52: 99-101.
99. LEMBKE, K. (1947). Untersuchungen and den Erreger der Tuberkulose. *Zbl. Bacter. Org.*, 152: 239-243.
100. LESSLIE, I.W. (1970). Los servicios de laboratorio como ayuda en la erradicación de la tuberculosis bovina. Primer Seminario Internacional sobre la Tuberculosis Bovina para las Americas. Universidad de Chile, Santiago, 21-25 Sept.
101. LEWIS, A.G., DUNBAR, F.P., LASCHE, E.M., BOND, J.O., LERNER, E.N., WHARTON, D.J., HARDY, A.V., and DAVIES, R. (1959). Chronic pulmonary disease due to atypical mycobacterial infections. *Am. Rev. Tuberc.*, 80: 188-192.
102. LINELL, F., and NORDEN, A. (1959). *Mycobacterium balnei*. *Acta Tuberculosa Scand.*, Suppl. XXXIII, Copenhagen.
103. LOEWENSTEIN, E. (1924). Beitrag zur Leistungsfähigkeit der direkten Züchtung der Tuberkelbazillen aus infektiösem Material. *Wien. Klin. Wschr.*, 37: 231-233.
104. MACHICAO, N., and LA PLACA, E. (1954). Lepra-like granulomas in frogs. *Lab. Invest.*, 3: 219-227.
105. MARR, A.G. (1960). Enzyme localization in bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.*, 14: 241-260.
106. MAXIMOW, A. (1928) - *Ann. Inst. Pasteur*, 42: 225; referido según HEIN, J., KLEINSCHMIDT, H., und UEHLINGER, E. (1958). *Handbuch der Tuberculose*, Band I, G. Thieme Ver., Stuttgart (pág. 160).
107. McCALLUM, P., TOLHURST, J.C., BUCKLE, G., and SISSONS, H.A. (1948). A new mycobacterial infection in man. I - Clinical aspects. II - Experimental investigations in laboratory animals. III - Pathology of the experimental lesions in the rat. IV - Cultivation of the new mycobacterium. *J. Path. a. Bacter.*, 60: 93-122.

108. McCLATCHY, J.K., WAGGONER, R.F., and LESTER, W. (1969). In vitro susceptibility of mycobacteria to rifampin. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 100: 234-236.
109. McQUILLEN, K. (1965). The physical organization of nucleic acid and protein synthesis. *Symp. Soc. Gen. Microbiol.*, 15: 134-158.
110. McRAE, D.H., and SHEPARD, C.C. (1971). Relationship between the staining quality of *M. leprae* and infectivity for mice. *Infection and Immunity*, 3: 116-120.
111. MEISSNER, G. (1960). Atypische Mycobakterien als Krankheitserreger. *Therap. Ber.*, 32: 73-78.
112. MERCAL, R.S., and LARSEN, A.B. (1962). Improved methods for primary cultivation of *M. paratuberculosis*. *Amer. J. Vet. Res.*, 23: 1307-1309.
113. MERCHANT, I.A., y PACKER, R.A. (1970). Bacteriología y Virología VETERINARIAS. Ed. ACRIBIA, Zaragoza (España), pág. 472.
114. MIDDLEBROOK, G. (1954). Isoniacid-resistance and catalasa activity of tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, 69: 471-472.
115. MIDDLEBROOK, G., DUBOS, R.J., and PIERCE, C.H. (1947). Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exper. Med.*, 86: 175-178.
116. MITCHELL, P. (1959). Biochemical cytology of microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.*, 13: 407-440.
117. MOORE, R. (1942) - *Am. J. Path.*, 18: 827; referido según HAGAN, W.A., BRUNER, D.W. y GILLESPIE, J.H. (1970). Enfermedades Infecciosas de los Animales Domésticos. 3º ed. española, La Prensa Médica Mexicana, México, D.F. (pág. 384).
118. MUCH, H. (1907). Ueber die granuläre, nach Ziehl nicht färbbare Form des Tuberkulosevirus. *Beitr. Klin. Tuberk.*, 8: 85-88.
119. MUDD, S., TAKEYA, K., and HENDERSON, H.J. (1956). Electron scattering granules and reducing sites in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 72: 767-783.
120. MUDD, S., YOSHIDA, A., and KOIKE, M. (1958). Polyphosphate as accumulator of phosphorus and energy. *J. Bacteriol.*, 75: 224-235.
121. MUROHASHI, T., and YOSHIDA, K. (1970). Attempts to the cultivation of *M. leprae* in cell-free, semi-synthetic media. *Internat. Leprosy Colloquium*, Borstel, Germany, August 26 to 27 (*Internat. J. Leprosy*, 39: N° 2, 1971).
122. NAKAMURA, M. (1973a). Multiplicación del *Mycobacterium lepraemurium* en un medio líquido libre de células. III - Factores que afectan la multiplicación del *M. lepraemurium* en el medio. *N.C.*, La Lepro., 42: 155-160; resumen tomado de *Rev. Lepr. Fontilles*, 9: 649 (1974).
123. NAKAMURA, M. (1973b). Multiplicación del *M. lepraemurium* en un medio líquido libre de células. IV - Establecimiento del medio NC-3. *La Lepro.*, 42: 161-164; resumen tomado de *Rev. Lepr. Fontilles*, 9: 649 (1974).

124. NAKAMURA, M. (1975). Multiplicación cuantitativa del *M. leprae-murium* en el medio líquido libre de células NC-5. Rev. Leprología Fontilles, 10: 65-66, —resumen—.
125. NEELSEN, F.K. (1883). Ein kasuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose. Centralblatt Med. Wissensch., 21: 47; referido según HEIN, J., KLEINSCHMIDT, H., und UEHLINGER, E. (1958). Handbuch der Tuberkulose. G. Thieme Ver., Stuttgart, 1º tomo, pág. 149.
126. OLITZKI, A.L. (1974). The relation between morphological changes of *Mycobacterium leprae* and its multiplication in different media. Boll. Ist. Sieroter. Milan, 53: 24-31.
127. OLITZKI, A.L., and GERSHON, Z. (1965). Maintenance of cythopathic activity of *M. leprae* in Eagle's medium supplemented by mycobacterial extracts. Israel J. Med. Sc., 1: 1004-1008.
128. OLITZKI, A.L., and GODINGER, D. (1967a). Studies on *M. leprae* in media enriched by mycobacterial extracts. Internat. J. Leprosy, 35: 154-165.
129. OLITZKI, A.L., GODINGER, D., OLITZKI, Z., and DORFMAN, M.L. (1967b). Microscopic, cultural and serologic studies on *Mycobacterium leprae* and other mycobacteria isolated from leprosy patients. Internat. J. Leprosy, 35: 166-174.
130. ORGANIZACION PANAMERICANA DE SALUD (1973). Manual de Bacteriología de la Tuberculosis. Técnicas y Procedimientos Básicos. Ed. OMS, Washington, D.C. (en castellano).
131. PARES, Y. (1974). Etude du cycle biologique de *M. leprae*. Acta Lepr., N° 55-56, pág. 21-25.
132. PATTYN, S.R. (1974). The problem of cultivation of *M. leprae*; a review with criteria for evaluating recent experimental work. Tropical Dis. Bull., 71: 1032-1033.
133. PETRAGNANI, C. (1926). Alcune utili modificazioni al mio terreno ed alla tecnica per l'isolamento in cultura pura del bacilli di Koch dagli escreti e da altri materiali tubercolari. Boll. Inst. Sieroter. Milan., 5: 173-178.
134. PETROFF, S.A. (1915). A new and rapid method for the isolation and cultivation of tubercle bacilli directly from the sputum and feces. J. Exp. Med., 21: 38-41.
135. PINNER, M. (1935). Atypical acid-fast microorganisms from human beings. Am. Rev. Tuberc., 32: 424-426.
136. PLA Y ARMENGOL, R. (1954). Estudios sobre Tuberculosis. Ed. U.T.E.H.A., México (pág. 497).
137. POLLAK, A., and BUHLER, V.B. (1955). The cultural characteristics and animal pathogenicity of an acid-fast organism which caused human disease. Am. Rev. Tuberc., 71: 74-81.
138. POLLAK, L. (1972). Características generales de las micobacterias. Laboratorio (Hosp. General del Sur, Maracaibo), 1: 1-19.
139. POLLAK, L. y QUINONES, R. (1962). Clasificación "in vitro" de las micobacterias. Rev. Tis. y Neumonol., 4: 59-64.

140. POPE, H., and SMITH, D.T. (1946). Synthesis of B-complex vitamins by tubercle bacilli when grown on synthetic media. *Am. Rev. Tuberc.*, 54: 559.
141. QUANDT, H. (1955) - referido según MERCK, E. (1955). *Medizinisch-chemische Untersuchungsmethoden*. Ver. Chemie Weinheim a.d.B., VIII Aufl. (pág. 212).
142. RANADIVE, K.J., BAPAT, C.V., and KHANOLKAR, V.R. (1962). Studies of pathogenicity of the ICRD bacillus isolated from human lepromatous leprosy. *Internat. J. Leprosy*, 30: 442-456.
143. REES, R.J.M., and VALENTINE, R.C. (1962). The appearance of dead leprosy bacilli by light and electron microscopy. *Internat. J. Leprosy*, 30: 1-9.
144. RICHARDS and MILLER, (1941) - *Am. J. Clin. Path.*, Techn Supp., 11 (Nº 5): 1; referido según KOLMER, J.A. (1948). *Métodos de laboratorio clínico*. Ed. Interamericana, México, D.F. (pág. 406).
145. ROTH, CARRARA y ERLÉNMEYER, (1953) *Helv. Chim. Acta*, 36: 1004; referido según POLLAK, L. y QUINONES, L.R. (1962). Clasificación "in vitro" de micobacterias. *Rev. Tisiolog. y Neumonol.* 4: 59-64.
146. RUNYON, E.H. (1959). Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. *Med. Clin. N. Amer.*, 43: 273.
147. RUNYON, E.M., SELIN, M.J., and HARRIS, H.W. (1959). Distinguishing mycobacteria by the niacin test. A modified procedure. *Am. Rev. Tuberc.*, 79: 663-671.
148. SALLE, A.J. (1957). *Bacteriología*. 1º edic., G. GILI, S.A., Barcelona (España).
149. SASANO, K.T., and MEDLAR, E.M. (1943). Egg-yolk-potato medium: its efficacy for demonstrating small numbers of tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.*, 48: 297-304.
150. SCHAEFER, W.B. (1965). Serologic identification and classification of the atypical mycobacteria by their agglutination. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 92: 85-93.
151. SHEPARD, C.C. (1961). The inoculation of leprosy bacilli into mice by the food-pad route. *Transactions Leonard Wood Memorial. Johns Hopkins Univ. Symposium on Research in Leprosy*, Baltimore, Md. (247-255).
152. SHEPARD, C.C., and McRAE, D.H. (1965). *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity and effect of cortisone. *J. of Bacteriology*, 89: 365-370.
153. SHINOHARA, C., FUKUSHI, K., and SUZUKI, J. (1957). Mitochondrial-like structures in ultrathin sections of *Mycobacterium avium*. *J. Bacteriol.*, 74: 413-415.
154. SHINOHARA, C., FUKUSHI, K., SUZUKI, J., and SATO, K. (1958) - The characteristics structure of *Mycobacterium tuberculosis*, relating to its function. *Proc. 4th Internat. Conf. Electron Microscopy*, 2: 529-531; referido según IMAEDA, T., and CONVIT, J. (1962), *J. Bacteriol.*, 83 (Nº 1): 43-52.

155. SOULE, M.H., and MCKINLEY, E.B. (1932). Cultivation of *M. leprae* with experimental lesions in monkeys. *American J. Trop. Med.*, 12: 1-36.
156. SOUZA ARAUJO, H.C., de (1950). Case of acute malignant leprosy, with infection of the consort within three months of matrimonial life. Isolation from a cutaneous lesion of the same patient of an acid-fast bacillus (Chromogenic culture) pathogenic for rats, mice, macacus rhesus and man. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 48: 76-99.
157. SOUZA ARAUJO, H.C., de (1959). Experiments in immunology of leprosy by means of inoculation of patients with living and dead suspensions of acid-fast bacilli cultures. Dpto. de Imprinta Nacional, Río de Janeiro. Brasil (en inglés y portugués).
158. SOUZA ARAUJO, H.C., de (1960). I - Bacteriology of rat leprosy. Electron micrographs of rat lepromas and cultures with thres plates from the Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. *Leprosy Rev.*, 31: 178-188.
159. STEFFEN, J. (1961). Mykobakterien Nachweis mit der Auraminfaerbung. *Zeiss Werkztschr.*, N° 41, pág. 61.
160. STONEBRINK, B., DOUMA, J., MANTEN, A., and MULDER, R.J. (1969). A comparative investigation on the quality of various culture media as used in the Netherlands for the isolation of mycobacteria. *Selected Papers R. Neth. Tuberc. Ass.*, 12: 5-47.
161. STORRS, E.E., WALSH, G.P., BURCHFIELD, H.P., and BINFORD, C.H. (1974). Leprosy in the armadillo: new model for biomedical research. *Trop. Dis. Bull.*, 71: 922-927.
162. SULA, L. y POLLAK, L. (1966). Características generales de las micobacterias. Curso de Entrenamiento de Microbiología de la Tuberculosis. El Algodonal, Caracas, 17 de Enero a 11 de Febrero.
163. SUTER, E. (1952). The multiplication of tubercle bacilli within normal phagocytes in tissue culture. *J. Exp. Med.*, 96: 137-150.
164. TACQUET, A., GERNEZ-RIEUX, Ch., et GAUDIER, B. (1954). L'hydrolyse de l'urée par les mycobactériés. *Ann. Inst. Pasteur*, 87: 355-359.
165. TACQUET, A., et al. (1967). Techniques for decontamination of pathological specimens for culturing mycobacteria. *Bull. Int. Un. Tuberc.*, 39: 21-24.
166. TAKEYA, K. (1959). Fine structures of bacterial cell. *Proc. 15th General Assembly Japan Med. Congr.*, 1: 100-107; referido según IMAEDA, T.-Internat. *J. Leprosy* (1965), 33: 669-683.
167. TAKEYA, K., KOIKE, M., UCHIDA, T., INOUE, S., and NOMIYAMA, K. (1954). Studies on the nature of the granules found in acid-fast bacilli. *J. Electronmicroscopy (Ciba)*, 2: 29-33.
168. TARSHIS, M.S., and FRISH, W. (1950). Blood media for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Clin. Path.*, 21: 101-105.
169. TARSHIS, M.S., WEED, W.A., KINSELLA, P.C., PARKER, M.V., and DUNHAM, W.B. (1955). Further experience with a new blood medium for the cultivation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Am. J. Publ. Health*, 45: 1157-1159.

170. TITTLE, A., and RUNYON, E.H. (1954). The relationship of "atypical" acid-fast bacteria to human disease. A preliminary report. *J. Lab. Clin. Med.*, 44: 202-207.
171. TWORT, F.W. (1910) - *Proc. Roy Soc. "B"*, 83: 156; referido según BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, VII Edition, The Williams a. Wilkins Co. Baltimore (pág. 705).
172. VAUDREMER, A. (1935). Nature, origine et role biologique du virus tuberculeux filtrant. Huitième Congrès National de la tuberculose, Marseille, Mason et Cie, Paris (págs. 1-10).
173. VIRTANEN, S. (1960). A study of nitrite reduction by mycobacteria. The use of the nitrite reduction test in the identification of mycobacteria. *Acta Tuberc. Scand.*, Supplement 48.
174. WEDMAN, E.E. (1966). Asistencia del laboratorio en programa del control y erradicación de la tuberculosis animal. *Memorias 5º Congr. Panam. Med. Vet.*, Caracas, 2: 618-626.
175. WEED, L.A., KEITH, H.M., and NEEDHAM, G.M. (1957). Non tuberculous and acid-fast bacilli in cervical adenitis. *Pediatrics*, 20: 688-672.
176. WEISE, (1955); referido según BAYER, E. (1955). Diagnóstico Microscópico en Medicina Tropical. Edic. Bayer, Leverkusen, Alemania (págs. 4-5).
177. WHEELER, E.A. (1959). Practical notes on technique for use in preparing sections from biopsies of the skin for histopathological examination; en COCHRANE, R.G. (1959). *Leprosy in Theory and Practice*. Ed. John Wright a. Sons, Bristol (págs. 377-381).
178. WOOD, L.E., BUHLER, V.B., and POLLAK, A. (1956). Human infection with the "Yellow" acid-fast bacillus. *Am. Rev. Tuberc.*, 73: 917.
179. XALABARDER, C. (1961). Micobacterias "inclasificadas". *Publ. Inst. Antituberc. "Francisco Moragas"*, 14: 5-23.
180. XALABARDER, C. Y BARNILS, M.L. (1962). La genética bacteriana vista con el microscopio electrónico. *Publ. Inst. Antituberc. "Francisco Moragas"*, Supl. 3, Barcelona (España).
181. YAMANE, I. (1957). A crystalline substance isolated from egg yolk which promotes growth of a minute inoculum of human tubercle bacilli. *Nature*, 179: 45-46.
182. YEGIAN, D., and BAISDEN, L. (1942). Factors affecting the beading of the tubercle bacillus stained by the Ziehl-Neelsen technique. *J. Bacteriol.*, 44: 667-672.
183. YEGIAN, D., and BUDD, V. (1943). ZIEHL-Neelsen technique. *Am. Rev. Tuberc.*, 48: 1-4.
184. YOUMANS, G.P., and YOUMANS, A.S. (1965). Effect of mycobacterial cell components upon susceptibility of mice to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Pro. Soc. Exp. Biol. Med.*, 120: 656-660.
185. YUGI, H., and NOSAKI, C. (1972). Serologic diagnosis of bovine tuberculosis. *Amer. J. Vet. Res.*, 33: 1377-1384.

186. ZAPATERO, E. (1962). *Microbiología médica*. 5º edic., Aldus S.A., Santander, España (págs. 447 y 450).
187. ZAPF, K. (1975). Ueber die Feinstruktur des Zytoplasmas in Ultradünnschnitten von *Mycobacterium tuberculosis* (BCG). *Naturwissenschaften*, 44: 448-449.
188. ZAPF, K. (1959). Vergleichende Untersuchungen zur Morphologie und Zytologie des *Mycobacterium tuberculosis* (BCG). II - Mitteilung: Licht und elektronenmikroskopische Befunde zum Kernproblem. *Zentr. Bakteriolog. Parasitenk., Orig.*, 174: 253-264.
189. ZIEHL, P. (1882). Zur Färbung des Tuberkelbacillus. *Dtsch. med. Wschr.*, 8: 451-452.
190. ZIEHL, P. y NEELSEN, F., referido según YEGIAN, D., and BUDD, V. (1943). Ziehl-Neelsen technique. *Am. Rev. Tuberc.*, 48: 1-4.