

# REVISTA DE LA FACULTAD DE MEDICINA

Volumen XIX

Bogotá, agosto de 1950

Número 2

Director, Profesor,

ALFREDO LUQUE B. Decano de la Facultad.

Jefe de Redacción, Doctor Rafael Carrizosa Argáez.

*Comité de Redacción:*

Prof. Alfonso Esguerra Gómez. Prof. Manuel José Luque. Prof Agr.  
Gustavo Guerrero I.

Administrador, José R. Durán Porto

Dirección: Calle 10 N° 13-99 — Bogotá — Apartado Nacional N° 400

Talleres Editoriales de la Universidad Nacional.

---

## Antagonismo del Colibacilo y el Bacilo de Koch en Presencia de Acido Sulfosalicílico.

Por Leonor Martínez Cáceres y Gonzalo Montes Duque

Este trabajo fué realizado en el Laboratorio de Investigaciones Médicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional.

Desde 1947, varios investigadores suizos señalaron las propiedades antagonicas, in vitro, de ciertas cepas de bacilo coli contra el bacilo tuberculoso de los tipos: Humano, Bovino, Gallináceo y Pisciarío.

Posteriormente Hesse y Jahnke (1) comunicaron sus experiencias clinicas de tratamiento de enfermos tuberculosos con suspensiones de bacilo coli y señalaron resultados muy alentadores en cuanto a signos radiológicos, cuadro hemático, sedimentación, baciloscopia, aumento de peso y curva térmica.

Con el objeto de comprobar el antagonismo que pudiera existir entre las cepas de bacilo Coli y bacilo Tuberculoso en nuestro medio

y además con el ánimo de hallar una cepa Coli activa, que sirviera para experiencias clínicas posteriores, se llevó a cabo una serie de experiencias *in vitro*, cuyos resultados son el objeto de esta publicación.

Simultáneamente se investigó la influencia del ácido sulfosalicílico sobre el desarrollo de los bacilos en cuestión.

### **CEPAS EMPLEADAS**

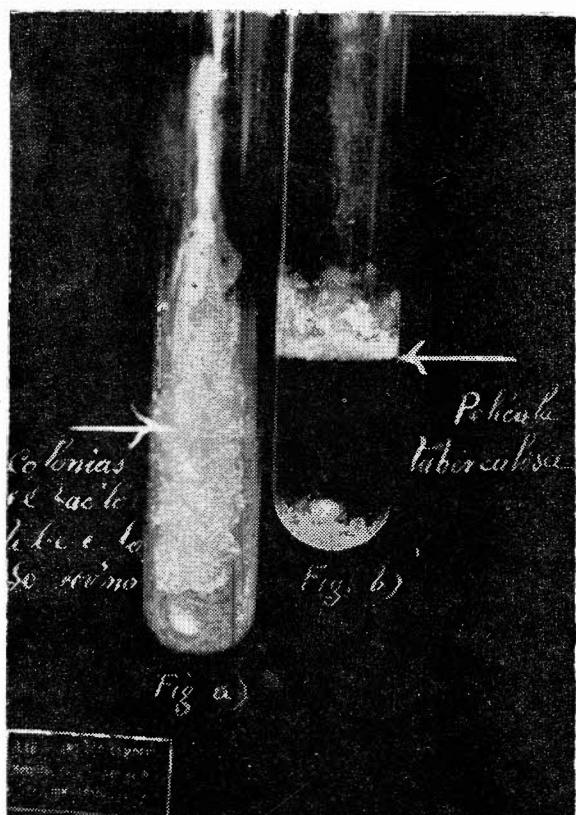
Las cepas de Bacilo de Koch fueron suministradas gentilmente por el doctor César Gómez V. del Instituto Nacional de Higiene Samper Martínez y corresponden a:

Bacilo Tuberculoso Humano (H37).

Bacilo Tuberculoso Bovino (HB) phi Bovine, cultivo IAR mayo 20 de 1947 from National Institute of Health of Washington.

Bacilo Tuberculoso Humano virulento (HV) 199 cultivo IBO Dic. 24 de 1947 from National Institute of Health of Washington.

En la fotografía siguiente puede apreciarse repiques de estas cepas, efectuados sobre los medios Lowestein y Sauton.



Fotografía N° 1.

- a) Cepa tuberculosa HB (Medio Lowenstein).
- b) Cepa tuberculosa H57 (Medio Sauton).

## CEPAS DE BACILOS COLI

### CEPA A.

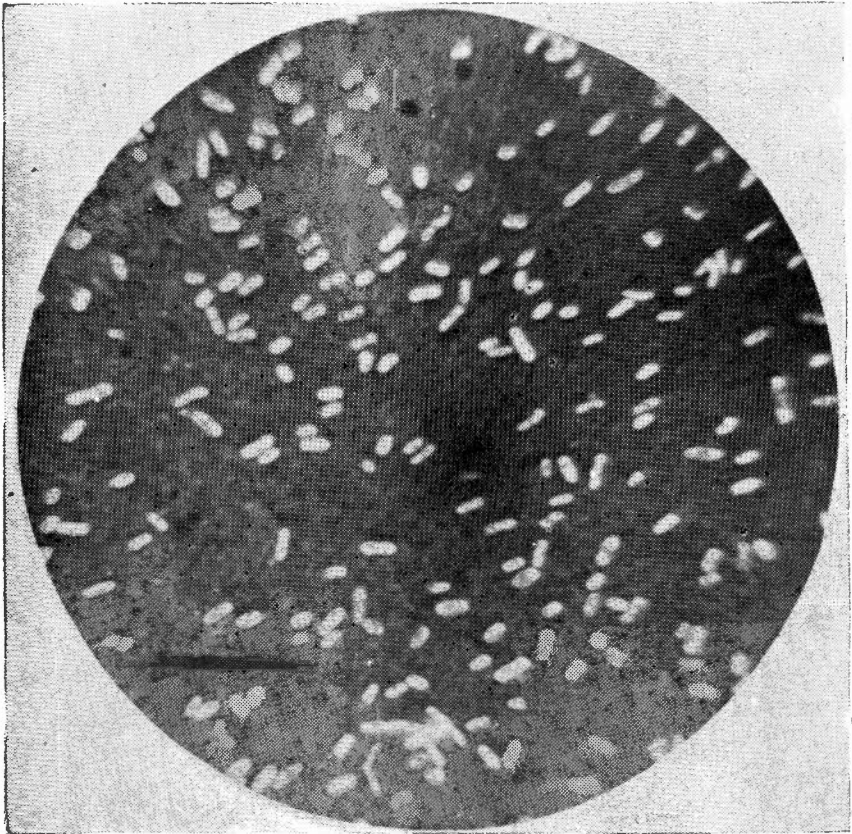
(Muestra tomada de las aguas del Río San Cristóbal. Octubre 30 de 1949).

#### *Aspecto Macroscópico.*

Sobre medio Agar Eosina Azul de Metileno, se obtuvieron colonias típicas de *Escherichia Coli*: planas, brillo metálico uniforme, ligera depresión central en algunas, poca tendencia a unirse, parte central oscura (0.5 m.m. aproximadamente).

Al examen en fresco se apreció movilidad positiva. —Es Gram-negativa.

Los tamaños de esta cepa, determinados sobre la adjunta fotografía, varían entre 7.5 y 3.5 micras, sobre 201 bacterias. —Tamaño promedio:  $2.08 \pm 0.12$  micras.



Fotografía N° 2.

## CEPA B.

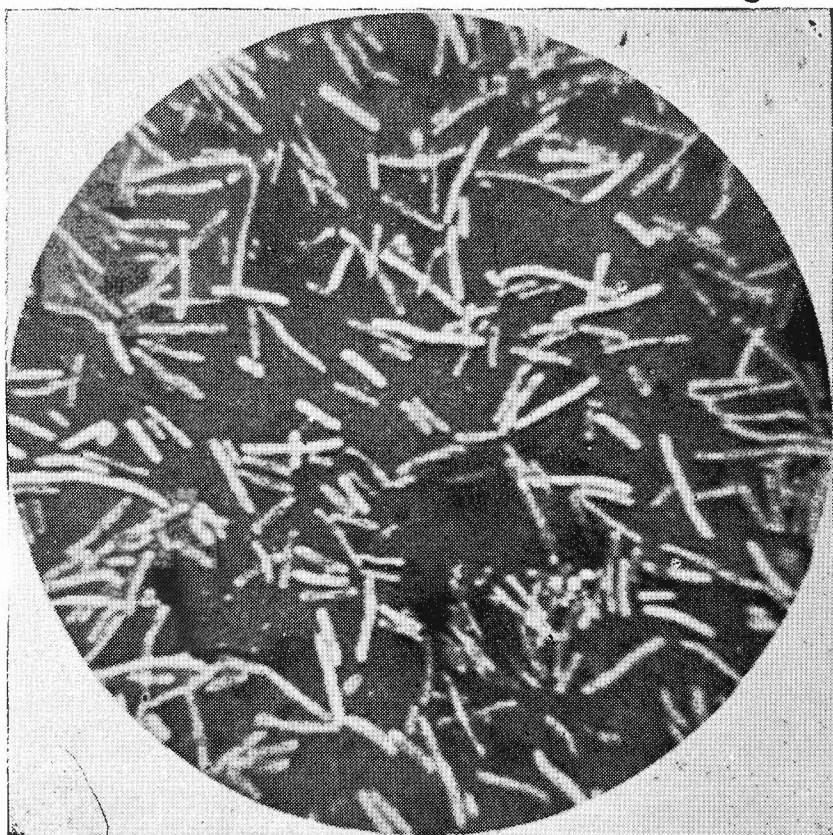
(Muestra tomada de las aguas del Río Tunjuelo. Octubre 30 de 1949)

### *Aspecto Macroscópico.*

En medio de Agar Eosina Azul de Metileno se encontraron colonias planas, con ligera depresión central, brillo metálico intenso, bordes dentados y de estructura granulosa; núcleo central pequeño (aproximadamente un tercio de la colonia), en forma de estrella. El resto o sean dos tercios, se presenta claro, progresivo hasta los bordes. —Estructura fibrosa.

### *Aspecto Microscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativo. El tamaño de esta cepa determinó sobre la siguiente microfotografía obteniendo el dato de  $4.26 \pm 0.72$  micras. Se encontraron tamaños desde 1.5 a 8.5 micras, en 234 bacterias.



Fotografía N° 3.

## CEPA C.

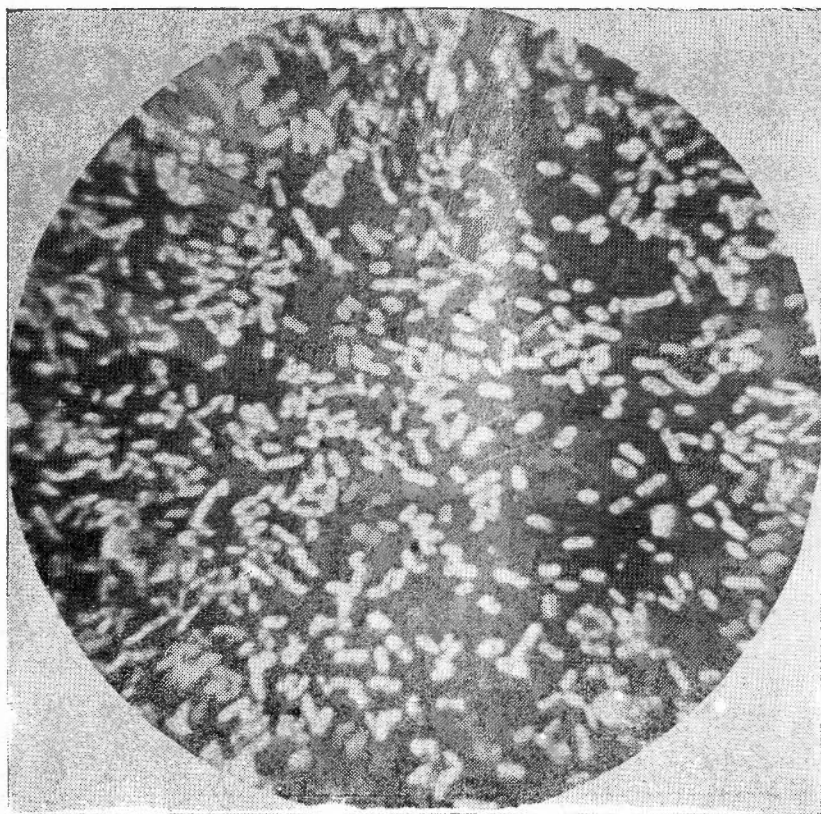
(Muestra tomada de las aguas del Río San Cristóbal. Noviembre 5 de 1949).

### *Aspecto Macroscópico.*

Sobre Agar Eosina Azul de Metileno, se obtuvieron colonias pequeñas de 0.5 a 1 mm. de diámetro; de estructura granular; núcleo pardo oscuro que comprende la mitad de la colonia. Halo periférico claro, ligeramente ondulado. Algunas colonias tienen una forma ligeramente convexa definida. La tendencia a unirse es muy marcada. El brillo metálico es definido e intenso.

### *Aspecto Microscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativo. El tamaño promedio de esta cepa, determinado en la fotografía adjunta sobre 512 bacterias es de  $2.03 \pm 0.97$  micras, se encontraron cifras entre 1.5 y 4.5 micras.



Fotografía N° 4.

## CEPA D.

(Muestra tomada de las aguas del Río Tunjuelo. Noviembre 7 de 1949).

### *Aspecto Macroscópica.*

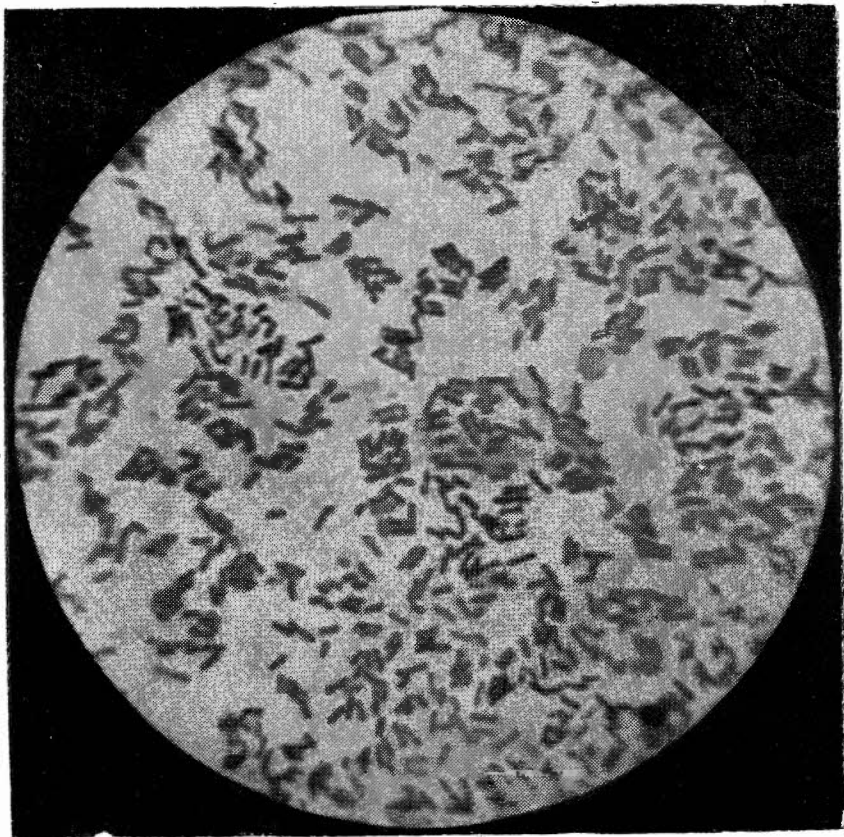
Sobre Agar Eosina Azul de Metileno se formaron colonias grandes de 1 a 2 mm. de diámetro.

*Luz Transmitida:* Núcleo Central granulado, bastante oscuro, tres cuartos de la colonia, borde ligeramente ondulado. Halo periférico pardo claro granulado.

*Luz Reflejada:* Colonias planas con ligera depresión central, brillo metálico únicamente en la depresión.

### *Aspecto Microscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativo. El tamaño promedio de esta cepa sobre un recuento de 629 bacterias es de  $1.87 \pm 0.42$  micras, se encontraron tamaños entre 1.5 y 3.5 micras. Las determinaciones se efectuaron sobre la siguiente fotografía.



Fotografía N° 5.

CEPA E<sub>1</sub>.

(Muestra de Origen Lácteo).

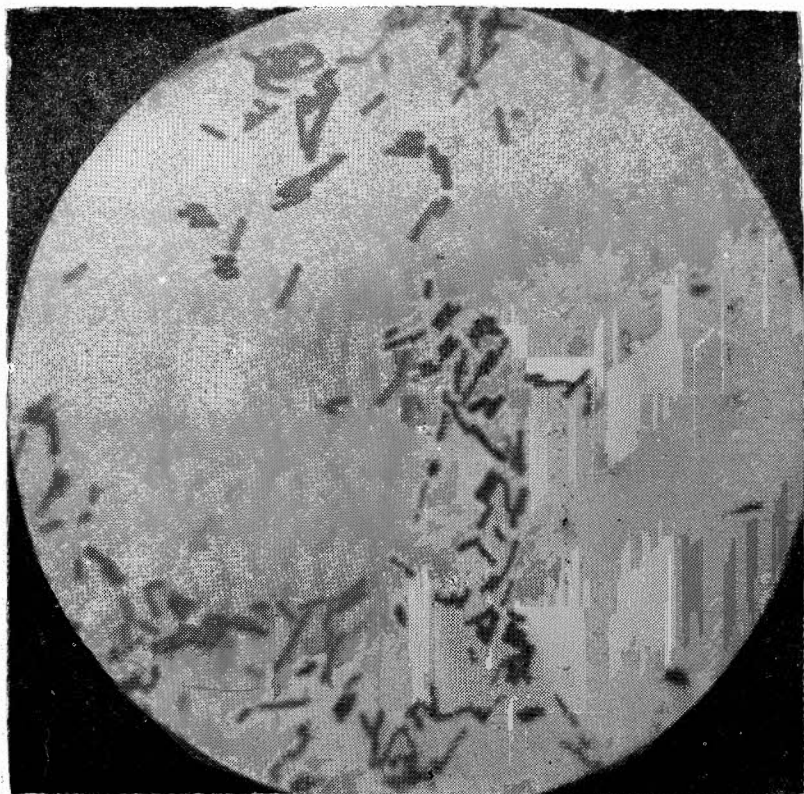
*Aspecto Macroscópico.*

*Luz Transmitida:* Sobre Agar Eosina Azul de Metileno, se obtuvieron colonias grandes de 2 mm. de diámetro como promedio. Bordes lobulados en el halo blanco, (mitad de la colonia). Estructura fibrosa. El núcleo es relativamente transparente con obscurecimiento gradual hacia el centro. La tendencia a unirse es muy definida.

*Luz Reflejada:* Colonias de forma plana sin depresión central. Brillo metálico periférico.

*Aspecto Macroscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativo. El tamaño promedio de esta cepa sobre un recuento de 185 bacterias y encontrando tamaños entre 1.5 y 6.5 micras, es de  $2.39 \pm 0.62$  micras.



Fotografía N° 6.



CEPA E<sub>2</sub>.

(Muestra de Origen Lácteo).

*Aspecto Macroscópico.*

Colonias grandes de 2 mm. de diámetro como promedio.

*Luz Transmitida:* Núcleo bastante oscuro, (tres cuartos de la colonia), granuloso, fibroso. Halo blanco ligeramente ondulado. Se presentan tres zonas en el núcleo.

a) Oscura, granulosa de igual espesor al halo blanco.

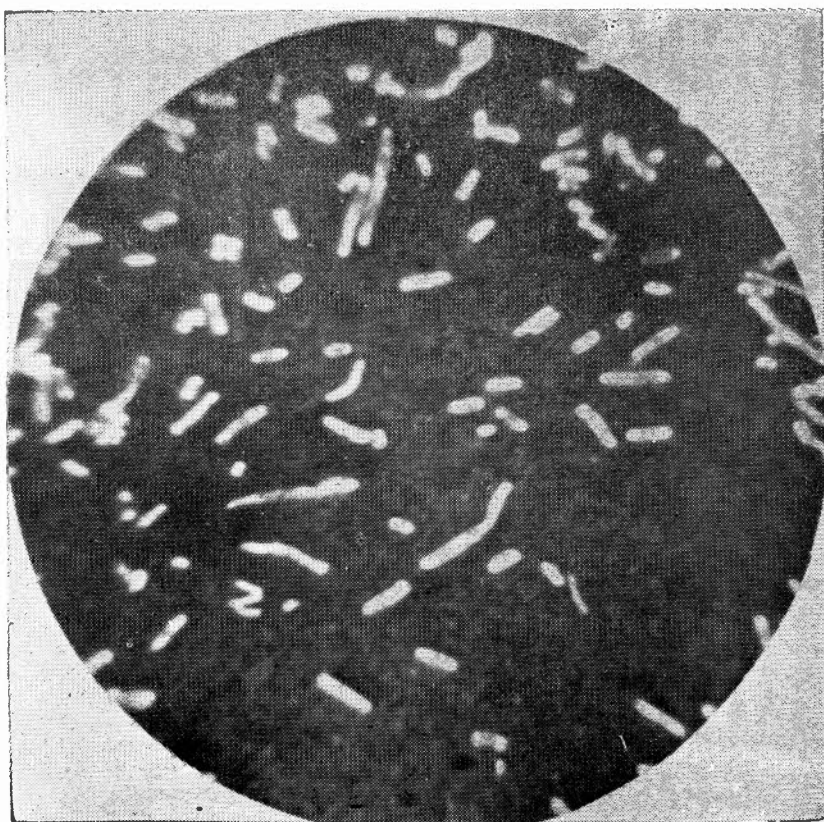
b) Clara, (menos oscura) mitad del núcleo fibrosa.

c) Central oscura.

*Luz Reflejada:* Brillo metálico muy tenue, prácticamente ausente.

*Aspecto Microscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativo. Tamaño promedio, sobre un recuento de 123 bacterias y habiendo encontrado elementos entre 1.5 y 9.5 micras, es de  $3.02 \pm 0.22$  micras; determinaciones efectuadas sobre la adjunta fotografía.



Fotografía N° 7.

CEPA E<sub>3</sub>.

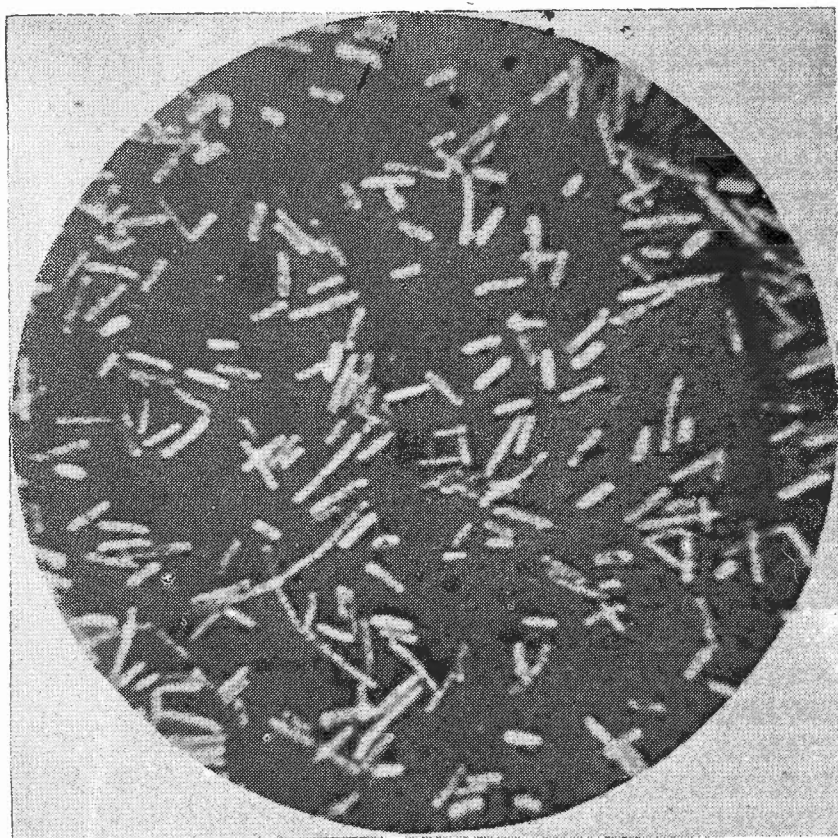
(Muestra tomada de las aguas del Río San Cristóbal)

*Aspecto Macroscópico.*

Sobre Agar Eosina Azul de Metileno se obtuvieron colonias grandes, algunas de dos o más mm. de diámetro. Núcleo casi negro con depresión central; halo dentado y de configuración irregular. Tendencia a unirse; brillo metálico periférico. (No hay brillo metálico en la parte central).

*Aspecto Microscópico.*

*Campo oscuro:* Algunas bacterias pueden considerarse gigantes. Todas son móviles y en las más grandes se puede ver un movimiento ondulante para lograr la traslación.



Fotografía N° 8.

La estructura interna parece granulada y se observan formas bipolares en la mayoría de las bacterias. Tendencia a formar cadenas, las cuales se encuentran completamente diferenciadas de las bacterias grandes en el punto de unión, como puede apreciarse claramente en la fotomicrografía anterior.

Por coloración son Gram-negativas, y se confirman las observaciones del campo oscuro.

El tamaño promedio de esta cepa es de  $3.84 \pm 0.48$  micras, en un recuento de 209 bacterias.

CEPA F.

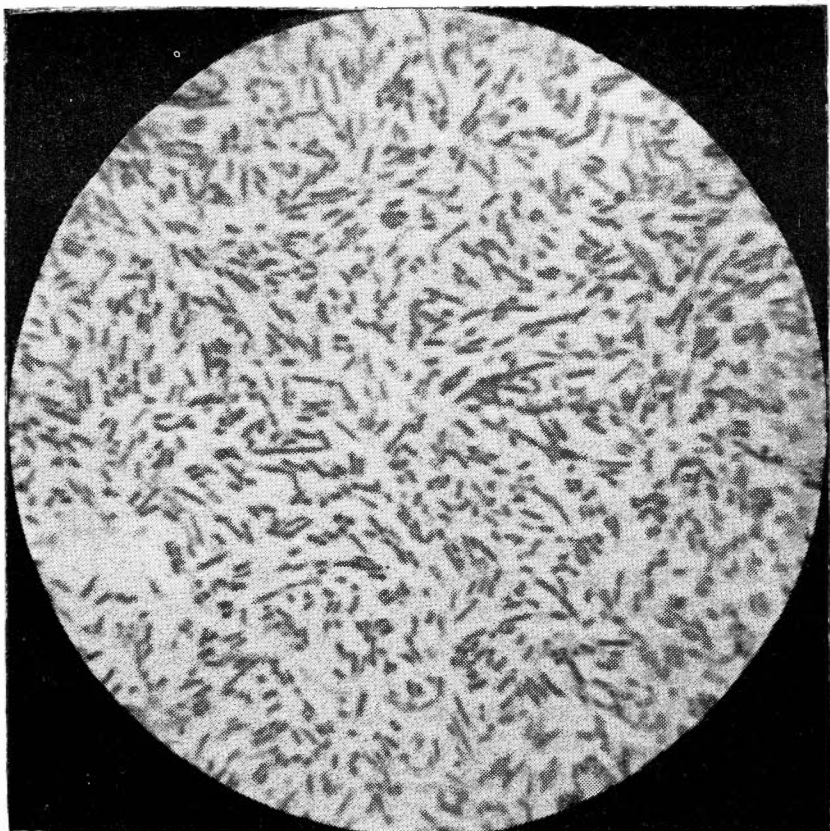
(Muestra de origen coprológico).

*Aspecto Macroscópico.*

Sobre Agar Eosina Azul de Metileno, se hallaron colonias pequeñas, de 0.5 mm. de diámetro.

*Luz Transmitida:* Núcleo oscuro, (tres cuartos de la colonia), fibroso. Halo blanco carmelita de borde regular.

*Luz Reflejada:* Colonias ligeramente levantadas en el centro. El brillo metálico es poco definido pero uniforme. Algunas colonias muestran una elevación punteada, central. La tendencia a unirse es muy marcada.



Fotografía N° 9.

*Aspecto Microscópico.*

Movilidad positiva. Gram-negativos. El tamaño promedio es de  $1.38 \pm 0.57$  micras, sobre 885 elementos que encerraron cifras desde 0.5 hasta 5.5 micras.

Los resultados finales de las determinaciones concernientes a las pruebas de Voges-Proskauer; Rojo de Metilo; Indol; Citrato; Sacarosa; Salicina; Eijman y examen en fresco (movilidad); para efectuar la clasificación de cada una de las cepas, anteriormente descritas, están comprendidos en el cuadro siguiente:

CEPAS	C. P.	M. R.	INDOL	CITRATO	EIJM.	SAC.	SAL.	MOVIL.
A	(—)	x	x	(—)	x	x	x	x
B	(—)	x	x	(—)	x	x	(—)	x
C	(—)	x	x	(—)	x	(—)	(—)	x
D	(—)	x	x	(—)	x	x	x	x
E <sub>1</sub>	(—)	x	x	(—)	x	(—)	x	x
E <sub>2</sub>	(—)	x	x	(—)	x	(—)	x	x
E <sub>3</sub>	(—)	x	x	x	x	x	x	x
F	(—)	x	x	(—)	x	x	x	x

Eijman a una temperatura de 46.5 grados centígrados.

SIMBOLOS: (—) = Reacción negativa.

x = Reacción positiva.

*Clasificación según las técnicas descritas por Bergey. (2)*

Siguiendo la clasificación de este último autor, se concluye que las cepas utilizadas en este trabajo corresponden a las siguientes variedades del género *Escherichia*:

CEPAS ESTUDIADAS	Escherichia coli comunis	$\left\{ \begin{array}{l} A \\ D \\ E_1 \\ E_2 \\ F \end{array} \right.$
	Escherichia coli acidilactici	C
	Escherichia coli comunior	B
	Escherichia coli intermedium	E <sup>3</sup>

## CAPITULO IV.

## PRUEBA N° 1.

a) *Observaciones sobre el desarrollo del colibacilo (cepa A) sembrado en medio de Sauton (selectivo para bacilo de Koch) en presencia de ácido sulfosalicílico y en ausencia del mismo:*

Se tomaron diez tubos de Durham, cada uno con 10 cc. de medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico en las concentraciones de 1 x 500; 1 x 660., hasta 1 x 20.000 y se sembraron con la cepa coli A (*Escherichia coli comunis*).

Se agregó un control de la misma, en medio Sauton, sin ácido sulfosalicílico y se controlaron sucesivamente.

*Observaciones.*

El colibacilo Cepa A presentó una fase de adaptación al medio, comprobada por la turbiedad total del mismo, observada al cabo de las 48 horas de sembrado; hecho que no ocurre en los medios de cultivo para el colibacilo, en los cuales manifiesta su crecimiento de las 12 a las 24 horas siguientes a la siembra. Además, hubo fermentación tardía pero creciente que se atribuye a la acción del colibacilo A sobre el glicerol del medio de cultivo.

Presentó la formación de una película sobrenadante, delgada, de aspecto grasoso, adherente a las paredes del tubo, fácilmente fragmentable y del mismo color del medio.

Se observó la presencia de sedimento en cantidad apreciable y variada. Este dato carece de valor por no haber sido determinada la

cantidad de colibacilo sembrada en los pases respectivos: 1.—Ver fotografía Nº 10. Fig. C.

Se hicieron repiques en caldo lactosado a partir de los tubos de experiencia y se obtuvo desarrollo del colibacilo A incluyendo los pases efectuados después de dos meses de prueba:

El control presentó turbiedad a las 48 horas de sembrado, fermentación en menor escala que la presentada por los tubos en prueba: presencia de escaso sedimento, y se mostró formación de película sobrenadante.

Los exámenes microscópicos efectuados, tanto de la cepa original, como de los cultivos en prueba, mostraron presencia de abundante colibacilo, completamente característico.

Posteriormente se comenzó otra experiencia similar a la anterior, variando únicamente la concentración del ácido sulfosalicílico. Los resultados obtenidos coincidieron con los expuestos anteriormente.

Se hicieron controles de cada tubo a los 24 días de cultivo, en caldo lactosado y en eosina azul de metileno agar, con resultados positivos para los cultivos cuya concentración en ácido no subió de  $1 \times 2.000$ .

Al mes se volvieron a repetir repiques de control, y se obtuvieron los mismos resultados.

Los exámenes microscópicos mostraron abundante colibacilo, en las muestras tomadas de los cinco primeros tubos.

Se concluye de esta prueba:

1. El colibacilo cepa A prende lentamente en el medio de Sauton, selectivo para el bacilo de Koch; alcanza su mayor desarrollo, después de 48 horas de sembrado.

2. El colibacilo cepa A tiene mayor poder de fermentación sobre el glicerol en presencia del ácido sulfosalicílico, en concentraciones débiles, que en ausencia del mismo.

3. El colibacilo cepa A forma una película sobrenadante, fina, adherente a las paredes del tubo, de aspecto grasoso, fragmentada y del mismo color del medio, en presencia del ácido sulfosalicílico en mínimas cantidades, la cual no aparece en el mismo medio, sin el ácido mencionado.

4. El colibacilo cepa A sembrado sobre medio Sauton, en presencia de ácido sulfosalicílico, agregado en cantidades pequeñas, conserva la facultad de proliferar por espacio de más de dos meses.

5. El colibacilo cepa A conserva sus propiedades culturales en medio Sauton, en presencia de ácido sulfosalicílico en concentraciones menores del  $1 \times 2.500$ .

b) *Desarrollo del bacilo tuberculoso sobre medio Sauton adicionado de ácido sulfosalicílico.*

Se tomaron diez tubos de prueba, cada uno con 10 cc. de medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico en concentraciones del 1 x 20.000 al 1 x 200.000. Se sembraron con bacilo tuberculoso, clasificado en las cepas H37 (bacilo tuberculoso humano) y HV (bacilo tuberculoso humano virulento). Se prepararon dos controles, uno para cada cepa empleada, en cada uno de los cuales se excluyó la presencia del ácido sulfosalicílico.

*Observaciones.*

Después de incubados estos tubos y de haber sido controlados diariamente, se comprobó que los correspondientes a la siembra de la cepa H37, presentaron formación de la película característica desarrollada en este medio por el *Mycobacterium Tuberculoso*. En este trabajo se observó rugosa, gruesa, cremosa, adherente a las paredes del tubo y de espesor variable.

El control presentó los caracteres propios a este bacilo.

Pasados dos meses se hicieron repiques de los primeros tubos (correspondientes a H37), en medio Sauton y se obtuvo un resultado positivo para el desarrollo del germen.

Los tubos correspondientes a la cepa HV y su respectivo control mostraron negatividad completa de crecimiento durante mes y medio.

Se concluye de esta prueba:

1. El bacilo tuberculoso humano, cepa H37, sembrado en medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico en concentraciones hasta del 1 x 20.000, prende bien y en poco tiempo (de ocho días en adelante).

2. El ácido sulfosalicílico suministrado en dosis bajas, no impide el crecimiento del *Mycobacterium tuberculoso*, cepa H37.

3. El bacilo tuberculoso, cepa H37, sembrado en medio Sauton y en presencia de ácido sulfosalicílico adicionado en cantidades pequeñas, conserva su actividad por más de dos meses.

4. La cepa HV (bacilo tuberculoso humano virulento), empleado en esta experiencia, no se desarrolló en los tubos de prueba, ni en el control, por consiguiente esa cepa se consideró muerta y fué eliminada.



## PRUEBA Nº 2.

*Acción simultánea del colibacilo y del ácido sulfosalicílico sobre bacilo tuberculoso humano en medio Sauton.*

a) *Cepas H37 y A en presencia de ácido sulfosalicílico al 0.1%.*

Se hicieron siembras simultáneas de las cepas H37 y A en presencia de ácido sulfosalicílico, en concentraciones crecientes sobre medio Sauton, 10 cc. para cada tubo.

Fecha 1949	Tubos	Medio Sauton	S. S al 0,1%	Concentración	Cepa Coli	Cepa Tub.
Dic. 22	1	10 cc.	0.05	1 x 200.000	A	H37
" "	2	10 cc.	0.10	1 x 100.000	A	H37
" "	3	10 cc.	0.15	1 x 66.000	A	H37
" "	4	10 cc.	—	—	A	H37
" "	5	10 cc.	—	—	A	H37

*Observaciones.*

En los tres primeros tubos en prueba, se presentó turbiedad del medio, sedimento y formación de una película sobrenadante, delgada, fragmentada, de aspecto grasoso y del mismo color del medio. Macroscópicamente muy semejante a la formada por el colibacilo cepa A., sobre medio Sauton, en presencia de ácido sulfosalicílico.

El control Nº 4 presentó las características culturales del colibacilo, y el Nº 5 las correspondientes la bacilo de Koch.

Se verificaron repiques de cada uno de los tres primeros tubos, sobre caldo lactosado, eosina azul de metileno agar, Sauton, comprobándose la negatividad de crecimiento de cada uno de los gérmenes en prueba, en los medios selectivos para cada uno de ellos, a partir de los 20 días de comenzada la experiencia.

Se observó que al cabo de mes y medio de efectuadas las siembras simultáneas, los tubos mencionados mostraron la desaparición del velo sobrenadante formado y anotado en las primeras semanas de cultivo. El aspecto microscópico de cada uno de estos tubos, puede verse aunque no completamente nítido, en la fotografía Nº 10, primer tubo señalado con la letra  $\alpha$ ), porque la película anteriormente descrita,

se aprecia perfectamente a simple vista, pero nó en los sistemas fotográficos corrientes.

Se efectuaron exámenes microscópicos en distintos tiempos de cada cultivo; se hicieron coloraciones de Ziehl Neelsen y Gram. Se observó que durante los 15 primeros días aparecieron bacilos ácido alcohol resistentes, característicos de la cepa H37; algunos gérmenes más grandes que los anteriores, pero aparentemente vacíos en el centro en donde presentan un tinte amarillento, refringente, de bordes y extremidades netos. Otros bacilos de la longitud del mycobacterium tuberculoso, pero más gruesos: de extremidades redondas, con una ácido-resistencia poco marcada en el cuerpo bacilar y acentuada en la periferia. Bacilos coli característicos bien teñidos.

Después de más de un mes de control microscópico, se observó que las formas bacilares, ácido-alcohol-resistentes, correspondientes a la concentración de  $1 \times 66.000$  de ácido sulfosalicílico, no volvieron a aparecer. En cambio abundaron las formas bacilares gigantes, refringentes y decreció la frecuencia del colibacilo.

Cabría preguntar si las modificaciones anteriormente expuestas podrían deberse a la acción combinada del colibacilo y del ácido sulfosalicílico, sobre el bacilo tuberculoso.

Se concluye de esta prueba:

1. El bacilo tuberculoso, cepa H37 (bacilo tuberculoso humano), no se desarrolla en presencia del colibacilo cepa A, (*Escherichia coli* comunis) sembrados simultáneamente en 10 cc. de medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico al  $1 \times 200.000$ ;  $1 \times 10.000$  y  $66.000$  para cada tubo.

a) Por ausencia de formación de la película característica del *Mycobacterium tuberculoso*.

b) Por su inactividad en los repiques efectuados en medio Sauton.

2. El colibacilo cepa A (*Escherichia coli* comunis), se desarrolla en presencia del bacilo tuberculoso, cepa H37 (bacilo tuberculoso humano), en medio Sauton adicionado de ácido sulfosalicílico.

3. El colibacilo demuestra desarrollarse en estos cultivos:

a) Por enturbiamiento del medio.

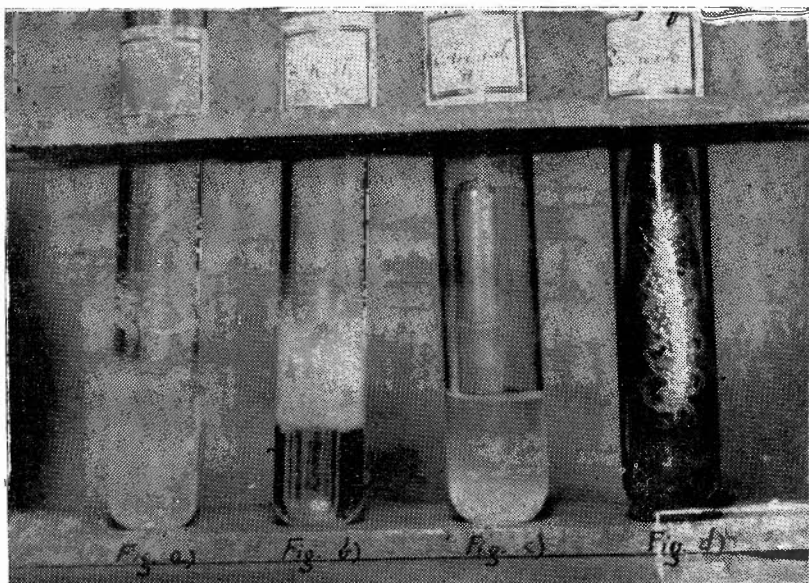
b) Por la formación de la película característica originada por este bacilo en presencia del ácido sulfosalicílico, sobre medio Sauton.

c) Por la presencia de la bacteria coliforme abundante en los cultivos, manifestada por los exámenes microscópicos efectuados.

4. Después de 20 días de efectuada la siembra simultánea del bacilo tuberculoso y del bacilo coli, tanto el primero como el segundo,

pierden sus propiedades de actividad germinativa puesto que no se desarrollan en los repiques efectuados.

5. En los cultivos anteriormente controlados se notó disminución en la incidencia del bacilo coli (cepa A) y especialmente del bacilo tuberculoso humano.



Fotografía Nº 10.

Figuras:

- a). Colibacilo Cepa A (*Escherichia coli* comunis). Bacilo tuberculoso (Medio Sauton).
- b) Bacilo tuberculoso bovino Cepa HB (Medio Sauton).
- c) Colibacilo Cepa A (*Escherichia coli* comunis). (Medio Sauton).
- d) Colibacilo Cepa A (*Escherichia coli* comunis). (Medio Eosina azul de metileno agar).

b) *Acción del bacilo coli sobre el bacilo tuberculoso cultivado en medio Sauton en presencia del ácido sulfosalicílico.*

Se tomaron 4 cultivos de bacilo tuberculoso humano (H37) sembrados, sobre medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico. De estos 4 tubos, se tomaron dos, en los cuales el cultivo aparecía muy abundante Nos. 2 y 4; un tercero en que estaba muy escaso Nº 1 y

finalmente, un cuarto tubo que presentaba un cultivo medianamente desarrollado (Nº 3). Todos fueron adicionados de colibacilo cepa A, a partir de un cultivo en medio Sauton, adicionado de ácido sulfosalicílico.

Los tubos 5 y 6, corresponden a los controles:

Fecha 1950	Tubos	Medio Sauton	Ac. S. S. 0.1%	Concentración	Cepa Tub.	Cepa colibacilar
Ene. 22	1	10 cc.	0.20 cc.	1 x 50.000	H37	A una asa Cul
Ene. 22	1	10 cc.	0.35 cc.	1 x 28.000	H37	A una asa Cul
" "	3	10 cc.	0.50 cc.	1 x 10.000	H37	A " " "
" "	4	10 cc.	0.30 cc.	1 x 33.000	H37	A 1 cc.
" "	5	10 cc.	—	—	—	A " " "
" "	6	10 cc.	—	—	—	A " " "

### Observaciones.

A los diez días de esta adición se notó en cada tubo lo siguiente: turbiedad, sedimento blanco proporcional a la película preformada del H37 y finalmente ocasionales fragmentos de película sobrenadante, algunos prendidos a las paredes del tubo y otros en suspensión. Se constató que el sedimento correspondía al velo característico del H37 que lentamente fue cayendo al fondo del tubo desde la superficie del medio.

Se efectuaron repiques en los medios de caldo lactosado, eosina azul de metileno agar, Sauton, a partir de los tres primeros tubos, los cuales recibieron respectivamente otra muestra del colibacilo A anteriormente usada. Se verificaron dos traspases más de esta cepa con intervalo de tres días cada una.

A los 20 días de prueba se encontró disminución de películas sobrenadantes, las cuales desaparecieron al mes.

Los repiques efectuados a los 10 días de prueba, mostraron en eosina azul de metileno Agar, la formación de colonias redondas, grandes, oscuras y opacas, bordes lisos sin brillo metálico.

El tubo correspondiente al Nº 4 en el cuadro anterior, en que había prendido exhuberantemente el bacilo tuberculoso y que fue sembrado con 1 cc. de cepa coli A cultivada en medio Sauton en presencia del ácido sulfosalicílico al uno por diez mil, para 10 cc.

de medio, se hizo turbio, disminuyó lentamente su película característica y aumentó su sedimento.

Al mes pudo comprobarse la ausencia del velo característico del bacilo tuberculoso y la aparición de una película sobrenadante delgada, homogénea y de aspecto grasoso, además de la turbiedad y aumento de sedimento ya anotados.

Se hicieron repiques sobre los medios empleados, a partir de los 20 días y un mes de controlado el cultivo.

En los primeros se notó lo siguiente: sobre medio de eosina azul de metileno agar, abundante presencia de colibacilo con sus características peculiares en este medio. En caldo lactosado, turbiedad y fermentación en 10% y presencia de escasa película grasosa. Finalmente en medio de Sauton: turbiedad, formación de una película delgada, homogénea y de aspecto grasoso. No se halló indicio de desarrollo del bacilo tuberculoso. No obstante, estos cultivos se controlaron por espacio de dos meses.

El repique efectuado sobre medio Sauton, a partir de mes y diez días, no presentó muestras de crecimiento bacteriano. Los controles correspondientes a los tubos 5 y 6 presentaron las características propias de cada cepa. El primero tiene la misma presencia de la cepa coli A, sembrada en cada tubo de esta prueba; y el segundo la de uno de los tubos empleados antes de la operación.

Se concluye de esta prueba:

1. Que la adición sucesiva en diferentes tiempos de bacilo coli A (cultivo de 15 días) a cultivo de bacilo tuberculoso (H37), adicionado de cantidades variables, de ácido sulfosalicílico, inhibió el desarrollo del bacilo tuberculoso en medio selectivo, puesto que este último germen no prendió en el medio Sauton.

2. Que se repitió el experimento anterior, agregando el bacilo coli una sola vez, en cantidad de un cc. de cultivo de 15 días y que el resultado cultural para el bacilo tuberculoso fué el mismo.

3. Que en el primer experimento se obtuvieron colonias de bacilo coli, a las cuales les faltaba únicamente como elemento característico el brillo metálico, y que sí se encontró en el segundo.

c) *Variaciones de estas mismas cepas cultivadas en presencia de ácido sulfosalicílico en concentraciones mayores.*

Esta experiencia se comenzó empleando medio Sauton adicionado de ácido sulfosalicílico en concentraciones de 1 por 1.300; 1 por

1.400; 1 por 1.450 etc... hasta 1 por 40.000, y se efectuaron siembras simultáneas de las cepas H37 y A.

Se adicionaron dos tubos más, como controles del bacilo coli y del mycobacterium respectivamente.

### *Observaciones.*

Se apreció turbiedad después de 48 horas de cultivo, además formación de película sobrenadante, delgada y adherente a las paredes del tubo; exceptuando el tubo control del bacilo de Koch. A los 8 y 10 días de cultivo, se efectuaron exámenes microscópicos encontrando a partir del cuarto tubo, inclusive, presencia de bacilos tuberculosos, algunos con granulaciones, pero en general relativamente escasos, formas bacilares refrigerantes, colibacilo característico y polimorfo, unas veces muy pequeño y otras agrandado, (rechoncho) coloreados heterogéneamente, es decir, algunos teñidos completamente que son los que caracterizan el colibacilo normal; otros hacia la periferia, o hacia las extremidades, o hacia el cuerpo bacilar. Además se encontraron elementos completamente carentes de color, que en ocasiones en contacto con el aceite de cedro, usado para el examen, asumen un aspecto refringente. No se pudo apreciar si estos elementos pertenecen al bacilo de Koch o al colibacilo: probablemente este fenómeno se deba a plasmolisis efectuada en los cuerpos bacterianos.

Este pleomorfismo se acentúa más en las muestras de los cultivos que llevan concentraciones de ácido sulfosalicílico mayores de  $1 \times 5.000$  no sin aparecer colibacilo característico pero en menor escala.

En los tres primeros tubos se hallaron abundantes formas colibacilares uniformes y bien teñidas.

A los 15 días se hicieron repiques de cada tubo, en caldo lactosado y Sauton adicionado en algunos tubos de ácido sulfosalicílico, y se obtuvieron los resultados que anotamos a continuación:

Los repiques correspondientes a los tubos cuyas concentraciones de ácido sulfosalicílico fueron 1 por 40.000; 1 por 20.000; 1 por 13.000 y 1 por 5.700 formaron en la superficie del medio una película viscosa, gruesa, blancuzca, sin presentar las características propias del bacilo tuberculoso. Esta formación se apreció con nitidez a los cinco días de cultivo; poco después fué perdiendo lentamente el aspecto mucilaginoso, tornándose en una película también sobrenadante pero seca, delgada y blanca.

Se efectuaron exámenes microscópicos tanto de la primera como

segunda fase, observándose abundantísimo colibacilo y ausencia total de bacilo de Koch.

Se hicieron nuevamente repiques a partir de los tubos originales, después de un mes de incubación, sobre caldo lactosado y Sauton, obteniendo en el primero: turbiedad y desprendimiento de gas en un 30% únicamente en los tubos cuyas concentraciones de ácido sulfosalicílico fueron de 1 por 10.000 y 1 por 5.700 y 1 por 4.500; y en el segundo, negatividad total de desarrollo del bacilo de Koch, en cada uno de los tubos sembrados.

Los exámenes microscópicos correspondientes a los tubos originales, efectuados después de un mes de cultivo, mostraron ausencia de bacilo tuberculoso y presencia de colibacilo; la mayoría de coloración desigual, agrupada hacia los extremos de cada bacilo.

También se hallaron formas colibacilares bien teñidas pero escasas. La película grasosa desapareció.

Después de dos meses se hicieron exámenes en fresco y se encontraron bacterias móviles en todos los tubos.

De esta prueba se concluye:

Que la adición de una cantidad variable de ácido sulfosalicílico, solamente influyó en establecer, modificaciones macro y microscópicas del colibacilo, tales como la formación de la película mucilaginosa y abundantes formas de plasmolisis que se supone sean del colibacilo.

### PRUEBA Nº 3.

*Acción simultánea de las cepas A (Escherichia coli comunis) y H37 (Tuberculosis Humana) en medio Sauton, excluyendo la presencia del Acido Sulfosalicílico.*

La experiencia se inició así: se tomaron 7 tubos de prueba, cada uno de los cuales contenía 10 cc. de medio Sauton. 5 de estos tubos se sembraron simultáneamente con las cepas H37 y A; el 6º tubo fué sembrado con colibacilo y el 7º tubo con bacilo tuberculoso.

#### *Observaciones.*

A las 48 horas de efectuadas las siembras, se encontró completa turbiedad en cada tubo, excluyendo el control para la cepa tuberculosa H37, indicio del desarrollo del colibacilo. Lentamente fué apareciendo la formación de un velo flotante, delgado, fragmentado y grasoso en

los cuatro primeros tubos. En el quinto tubo se observó a partir del cuarto día de incubación, la aparición de una película muy semejante a la formada por el *Mycobacterium tuberculosis*, que aumentó notoriamente alcanzando su mayor desarrollo después de 20 días de prueba. Luego fue disminuyendo hasta quedar una ligera muestra de ella y huellas de una película grasosa fina.

En todos los tubos se encontró sedimento. El tubo N° 7 correspondiente al control del bacilo tuberculoso presentó las características propias del *Mycobacterium*.

Se hicieron repiques de cada tubo en los medios Caldo Lactosado, Eosina Azul de Meileno Agar y Sauton, comprobándose que los efectuados a los 8 días de cultivo, mostraron desarrollo del colibacilo en los medios selectivos para éste y en medio Sauton turbiedad. Únicamente el repique del quinto tubo, en Sauton, tubo formación de una película fina, grasosa, semejante a la mencionada en las pruebas anteriores.

Los repiques correspondientes a los 15 días de incubación de los tubos originales, manifestaron crecimiento del colibacilo, con fermentación de la lactosa y desprendimiento de gas en 30% pero no se halló indicio de desarrollo del bacilo de Koch.

Los pases hechos a los 25 días enseñaron crecimiento del colibacilo en caldo lactosado; ausencia de enturbiamiento sobre medio Sauton y carencia de desarrollo del H37. Los exámenes efectuados en fresco tanto a los cultivos originales como a los repiques prendidos, después de dos meses de prueba, mostraron movilidad bacteriana.

Finalmente los repiques efectuados al mes no mostraron indicio de desarrollo del colibacilo, ni del bacilo de Koch. Estos tubos repicados se controlaron por espacio de un mes.

Se sembraron muestras de los primeros repiques, sobre caldo lactosado y Sauton con resultado positivo para el crecimiento del colibacilo. Uno de estos, examinado microscópicamente, después de 10 días de sembrado, mostró por coloración de Gram, abundantísimo colibacilo, bien teñido, excluyendo algunos bacilos de coloración débil y desigual un poco alargados y ensanchados. Por la coloración de Ziehl Neelsen, ausencia total de bacilos ácido-alcohol-resistentes.

Los exámenes microscópicos efectuados a los 10 y 15 días y un mes de incubación de los cultivos originales, revelaron la presencia de bacilos ácido-alcohol-resistentes, y los correspondientes al mes y medio de cultivo, mostraron colibacilo característico relativamente escaso, formas colibacilares polimorfas, algunas alargadas y débilmente o no



teñidas, en una de sus extremidades. Finalmente ausencia del bacilo de Koch.

Se concluye de esta prueba:

1. El colibacilo cepa A (*Escherichia coli* comunis) sembrado simultáneamente con el bacilo tuberculoso, cepa H37 (tuberculoso humano), sobre medio Sauton, enturbia completamente el medio, después de 48 horas de incubado, manifestando su desarrollo en los repiques efectuados sobre medios selectivos; y en los exámenes microscópicos de los cultivos originales y pases respectivos. Mantiene su actividad germinativa por espacio de 25 días después de efectuada la prueba, y la pierde totalmente después de un mes.

2. Que al examen microscópico efectuado al comenzar la experiencia, se encontró el bacilo tuberculoso asociado con el colibacilo en los velos formados, pero que no se pudo obtener crecimiento del bacilo de Koch en los repiques hechos sobre medio selectivo para el mismo, —hecho que puede interpretarse como causado por la muerte del germen—.

#### PRUEBA Nº 4.

*Acción simultánea de las cepas A (Escherichia coli comunis) y HB (Bacilo Tuberculoso bovino) en presencia de ácido sulfosalicílico.*

Se empleó medio Sauton adicionado de Acido Sulfosalicílico en las concentraciones de 1 por 100; 1 por 200 etc., hasta 1 por 20.000 y se hizo la siembra simultánea de las cepas HB y A. Además se pusieron dos controles para cada una de las cepas en cuestión.

#### *Observaciones.*

A las 24 horas de incubación se notó ligera opalescencia en los tubos cuyas concentraciones de ácido sulfosalicílico oscilaban entre 1 por 20.000 y 1 por 1.000. También en el tubo correspondiente al control del colibacilo. De las 48 horas en adelante se apreció franca turbiedad en los mismos. A las 96 horas se presentó formación de película sobrenadante, delgada, adherente, de aspecto grasoso y del color del medio; sedimento escaso. La película mencionada desapareció después de un mes de incubación.

Los tubos correspondientes a las concentraciones de 1 por 100

y 1 por 200 de ácido sulfosalicílico no mostraron señal de crecimiento bacteriano.

Los tubos controles presentaron las características propias de cada bacilo.

Después de 20 días de incubación se efectuaron repiques sobre medios Sauton y Eosina Azul de Metileno Agar, y se obtuvo en el primero: turbiedad sin formación de película grasosa y sin sedimento, a partir de los pases correspondientes a los tubos cuyas concentraciones de ácido sulfosalicílico comprendían desde 1 por 20.000 hasta 1 por 2.500. Tales cultivos se controlaron por 15 días sin notar variación alguna. En el segundo se hallaron colonias típicas de bacilo coli, también en los pases correspondientes a las concentraciones anteriores.

La falta de desarrollo bacteriano en los otros tubos se atribuye a la elevada concentración de ácido sulfosalicílico adicionada.

Los exámenes microscópicos efectuados en los primeros días de cultivo, señalaron la presencia de bacilo tuberculoso, poco abundante, de colibacilo polimorfo y de bacilos completamente vacíos, de contornos y tamaño muy similares al colibacilo. En algunos campos tienen aspecto refringente.

Los exámenes microscópicos efectuados después de mes y medio de cultivo de cada tubo original, mostraron bacilo tuberculoso en cantidad apreciable. Colibacilo en su mayoría polimorfo y de desigual coloración, con predominio del tamaño pequeño.

Se concluye:

1. Que el hecho de haber encontrado bacilos ácido-alcohol-resistentes en todos los cultivos después de mes y medio de observación, se deba probablemente a elementos muertos, puesto que los repiques efectuados en medios selectivos, no prendieron.

2. También se puede anotar que las concentraciones de 1 por 200 y 1 por 100 de ácido sulfosalicílico impiden completamente el desarrollo de ambos gérmenes.

3. Que las concentraciones menores de 1 por 1.000 de ácido sulfosalicílico se comportan igualmente frente al bacilo tuberculoso en presencia del colibacilo.

Después se efectuó otra experiencia similar a la anterior, variando únicamente la concentración del ácido sulfosalicílico desde 1 por 40.000 hasta 1 por 1.500.

Los cultivos se observaron y controlaron por repiques y exámenes microscópicos, por espacio de dos meses y se pudieron comprobar los resultados anotados en el ensayo anterior.

## PRUEBA Nº 5.

*Generalizaciones sobre la acción recíproca de las cepas clasificadas: B (Escherichia coli comunior); C (Escherichia coli acidilactici); E<sub>3</sub> (Escherichia coli intermedium); y F (Escherichia coli comunis), con las cepas H37 (bacilo tuberculoso humano) y HB (bacilo tuberculoso bovino), en presencia del ácido sulfosalicílico.*

Para cada cepa coli clasificada se tomaron dos grupos de tubos de ensayo, con medio Sauton, cada uno designado para una distinta cepa tuberculosa y formado por tres tubos, a cada uno de los cuales se les adicionó ácido sulfosalicílico en las concentraciones de: 1 x 1.500; 1 por 4.000 y 1 por 20.000. Además se agregaron dos tubos controles, uno para la cepa colibacilar y otro para la respectiva cepa tuberculosa. Las siembras se efectuaron simultáneamente.

*Observaciones.*

Los cultivos fueron observados diariamente y controlados cada ocho, quince, veinte, treinta y cuarenta y cinco días, por exámenes microscópicos y repiques efectuados sobre caldo lactosado; eosina azul de metileno agar y Sauton; con lo cual pudo comprobarse:

1. Desarrollo de las cepas coli.
2. Ausencia de desarrollo del bacilo tuberculoso.
3. Desarrollo normal del bacilo tuberculoso en los controles correspondientes.
4. Pérdida de la actividad germinativa de las cepas Coli:
  - B. (Escherichia coli comunior);
  - C. (Escherichia coli acidilactici);
  - F. (Escherichia coli comunis); excluyendo la cepa E<sub>3</sub> (Escherichia coli intermedium), que sí se mostró activa, después de mes y medio de control, en las condiciones de la experiencia.

## PRUEBA Nº 6.

*Determinación, comparación y relación de Ph de los medios de cultivo empleados y de los mismos, después de haber sido sembrados.*

La reacción del medio de cultivo para el desarrollo bacteriano es de importancia vital, puesto que pasando de ciertos límites lo impide completamente.

La concentración de hidrogeniones más favorable para la germinación del bacilo tuberculoso, varía de acuerdo con el tipo de mycobacterium de que se trate, así por ejemplo para el bacilo tuberculoso tipo humano, está comprendida entre un Ph 7, 4 a 8; y para el bacilo tuberculoso tipo bovino Ph de 5.8 a 6.9. (Ishimori 1924).

El bacilo tuberculoso humano, alcalinizado primero el medio y luego lo acidifica, en cambio, el bacilo tuberculoso bovino, jamás lo acidifica. (7).

Las cifras de Ph señaladas en este trabajo fueron determinadas en potenciómetro para los medios de cultivo empleados y para los mismos, adicionados de concentraciones diferentes de ácido sulfosalicílico y en colorímetro para los cultivos propiamente dichos.

El cuadro siguiente encierra los datos obtenidos en las determinaciones efectuadas a los medios de cultivo:

Caldo lactosado ... ..	Ph...6.97	Indicador Universal Recién preparada.
Medio Lowestein ... ..	Ph...7.20	
Medio Petraghiani ... ..	Ph...7.40	
Medio Sauton ... ..	Ph...7.50	

*Medio Sauton adicionado de ácido sulfosalicílico en la siguiente proporción.*

Sauton	A. Sulfosalicílico 1%	Concentración	PH.
10 cc.	0.05 cc.	1 por 20.000	7.46
10 cc.	0.10 cc.	1 por 10.000	7.31
10 cc.	0.20 cc.	1 por 5.000	7.14
10 cc.	0.30 cc.	1 por 3.300	6.92
10 cc.	0.40 cc.	1 por 2.500	6.70
10 cc.	0.50 cc.	1 por 2.000	6.50
10 cc.	1.00 cc.	1 por 1.000	5.95
10 cc.	1.50 cc.	1 por 660	5.25
10 cc.	2.00 cc.	1 por 500	4.80
10 cc.	5.00 cc.	1 por 100	3.00

#### A. Sulfosalicílico 0.5%

10 cc.	0.05 cc.	1 por 40.000	7.42
10 cc.	0.10 cc.	1 por 20.000	7.40
10 cc.	0.15 cc.	1 por 15.000	7.36
10 cc.	0.20 cc.	1 por 10.000	7.31
10 cc.	0.25 cc.	1 por 8.000	7.25

## A. Sulfosalicílico 0.5%

10 cc.	0.30 cc.	1 por	7.500	7.20
10 cc.	0.35 cc.	1 por	5.600	7.15
10 cc.	0.40 cc.	1 por	5.000	7.06
10 cc.	0.45 cc.	1 por	4.500	7.01
10 cc.	0.50 cc.	1 por	4.000	6.98
10 cc.	1.00 cc.	1 por	2.000	6.60
10 cc.	1.50 cc.	1 por	1.500	6.10
10 cc.	2.00 cc.	1 por	1.000	5.82
10 cc.	5.00 cc.	1 por	400	4.20

## A. Sulfosalicílico 0.1%

10 cc.	0.05 cc.	1 por	200.000	7.45
10 cc.	0.10 cc.	1 por	100.000	7.45
10 cc.	0.15 cc.	1 por	66.000	7.45
10 cc.	0.20 cc.	1 por	50.000	7.42
10 cc.	0.25 cc.	1 por	40.000	7.42
10 cc.	0.30 cc.	1 por	33.000	7.42
10 cc.	0.35 cc.	1 por	28.000	7.41
10 cc.	0.40 cc.	1 por	25.000	7.41
10 cc.	0.45 cc.	1 por	22.000	7.40
10 cc.	0.50 cc.	1 por	20.000	7.40
10 cc.	1.00 cc.	1 por	10.000	7.30
10 cc.	1.50 cc.	1 por	6.000	7.20

*Observaciones.*

En la prueba Nº 4 puede demostrarse que las siembras efectuadas en medio Sauton adicionado de ácido sulfosalicílico en concentración al 1 por 100, no mostraron indicio de desarrollo y teniendo en cuenta el pH inicial del medio (4.2) se puede deducir que el exceso de caidez, marcado con la cifra anterior es inducir que el exceso de acidez, marcado con la cifra anterior es incompatible con la germinación bacteriana.

El esquema adjunto presenta los datos de Ph tomados, primero de cultivos de las cepas H37 y A sobre medio Sauton; segundo, de la cepa A, sobre el mismo medio, adicionado de ácido sulfosalicílico al 0.1%; tercero, de las cepas H37 y A sobre Sauton con ácido sulfosalicílico al 0.1%; cuarto, sobre los cultivos de las cepas anteriores y HB

en presencia de ácido sulfosalicílico al 0.5%; y quinto, de cultivos de las cepas H37 y HB más cepas coli B. C.E<sub>3</sub> y F, en presencia del mismo ácido al 0.5%.

Medio Sauton	Cepa Coli	Cepa Tuberculosa	Acido Sulfosalicílico		Concentración	Pb
10 cc.	A	H37	0.1%	0.05 cc.		5.5
10 cc.	A	H37				5.6
10 cc.	A	—	0.1%	0.05 cc.	1 x 200.000	5.7
10 cc.	A	—	0.1%	0.15 cc.	1 x 66.000	5.7
10 cc.	A	—	0.1%	0.20 cc.	1 x 50.000	5.7
10 cc.	A	—	0.1%	0.30 cc.	1 x 33.000	5.4
10 cc.	A	—	1.1%	0.40 cc.	1 x 25.000	5.5
10 cc.	A	—	0.1%	0.50 cc.	1 x 10.000	5.4
10 cc.	A	H37	0.1%	0.05 cc.	1 x 200.000	5.9
10 cc.	A	H37	0.1%	0.15 cc.	1 x 66.000	5.8
10 cc.	A	H37	0.1%	0.20 cc.	1 x 50.000	5.6
10 cc.	A	H37	0.1%	0.30 cc.	1 x 33.000	5.4
10 cc.	A	H37	0.1%	0.35 cc.	1 x 28.000	5.5
10 cc.	A	H37	0.1%	0.50 cc.	1 x 10.000	5.5
10 cc.	A	H37	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.4
10 cc.	A	H37	0.5%	0.5 cc.	1 x 4.000	5.4
10 cc.	A	H37	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.2
10 cc.	A	H37	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.4
10 cc.	A	H37	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.4
10 cc.	B	—	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.4
10 cc.	B	H37	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.4
10 cc.	B	H37	0.5%	0.5 cc.	1 x 1.500	5.6
10 cc.	B	HB	0.5%	0.5 cc.	1 x 4.000	5.2
10 cc.	C	—	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.6
10 cc.	C	H37	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.8
10 cc.	C	H37	0.5%	0.5 cc.	1 x 4.000	5.6
10 cc.	C	H37	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.8
10 cc.	C	HB	0.5%	0.5 cc.	1 x 4.000	5.6
10 cc.	C	HB	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.6
10 cc.	E <sub>3</sub>	—	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.5
10 cc.	E <sub>3</sub>	HB	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.4
10 cc.	E <sub>3</sub>	HB	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.5

10 cc.	F	H37	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	6.1
10 cc.	F	H37	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.4
10 cc.	F	HB	0.5%	0.1 cc.	1 x 20.000	5.8
10 cc.	F	HB	0.5%	1.5 cc.	1 x 1.500	5.7

## NOTA:

Estas determinaciones fueron hechas después de uno y medio y dos meses de efectuadas las siembras de los respectivos cultivos.

Por los resultados anteriores puede deducirse que el Ph de los medios de cultivo se va haciendo ácido desde el comienzo de la incubación, hasta llegar a un Ph no menor de 5.2 tanto en los cultivos adicionados de ácido sulfosalicílico como en los no añadidos del mismo.

Además, por los controles de los cultivos llevados a cabo y ampliamente demostrados en las pruebas anteriores, resalta que los cultivos de la cepa coli A (*escherichia coli* comunis) en medio Sauton en presencia de ácido sulfosalicílico mostraron desarrollo bacteriano en los repiques efectuados a partir de los mismos, después de mes y medio de incubación y cuyos cultivos originales tenían Ph no inferior a 5.4; y que los cultivos de bacilo tuberculoso y coli en sus distintas cepas en Sauton en presencia de ácido sulfosalicílico con Ph similar a los anteriores, no dieron indicio de desarrollo bacteriano, después del mismo tiempo de incubación, es decir, después de mes y medio de control.

## PRUEBA Nº 7.

a) Observaciones sobre cultivos de Colibacilo en medio Petrag-nani adicionado de verde de malaquita en la concentración del 1 por 10.000.

b) Observaciones sobre el desarrollo simultáneo del Colibacilo y del Bacilo de Koch, en cajas de petri sobre medio Petrag-nani, adicio-nado de verde de malaquita en concentración del 1 por 10.000.

a) El color inicial del medio empleado es amarillo limón. Al ser sembrado de Colibacilo vira el color hacia uno verde intenso; en una extensión variable unas veces y otras en la totalidad del medio.

Esto pudo observarse en repetidos cultivos y en aquellos cuya concentración de indicador fué mayor, alcanzando en ellos un tono bastante subido y fácil de diferenciar.

El Colibacilo forma colonias grandes, redondas o en masas extendidas, de aspecto brillante. Sus bordes pueden ser lisos o ligeramente ondulados.

El bacilo de Koch cultivado en el mismo medio no vira el color inicial.

b) Se tomaron tres cajas de petri con medio Petragnani y se sembraron de la siguiente manera:

#### *Caja N° 1:*

Se colocó un penicilindro en el centro de la caja y se llenó de suspensión de cultivo coli en caldo lactosado (1 cc.) cepa A, cuya procedencia está ampliamente descrita en la primera parte de este trabajo. A su alrededor y a una distancia radial no menor de 3 cms. se sembró bacilo tuberculoso de origen humano.

#### *Observaciones.*

Desde el tercer día de incubación comenzó a formarse una zona de color verde intenso, alrededor del penicilindro, que se extendió sin cubrir todo el medio. El bacilo de Koch comenzó a manifestar su desarrollo desde el décimo día de cultivo y fué progresando lentamente sin hacer virar el color del medio en la zona correspondiente.

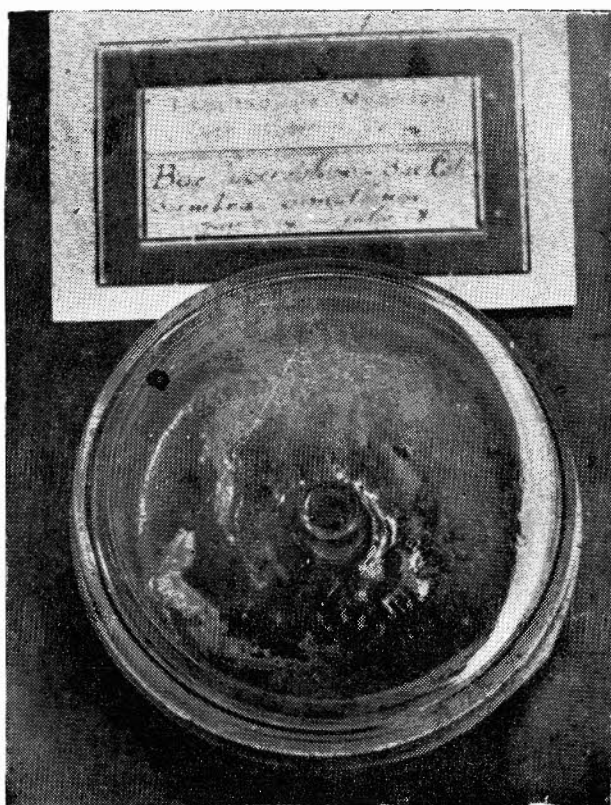
Al cabo de un mes pudo apreciarse claramente la extensión de la zona de mayor inteisidad de color; colonias características del colibacilo extendidas en masa y adyacentes al penicilindro. El bacilo de Koch manifestó su crecimiento en una banda circular, amarillenta, que nó penetró la zona hasta donde se extendió el viraje del medio, debido probablemente a una difusión de productos de metabolismo del colibacilo.

Esto puede apreciarse bien en la fotografía N° 11 y en el esquema adjunto.

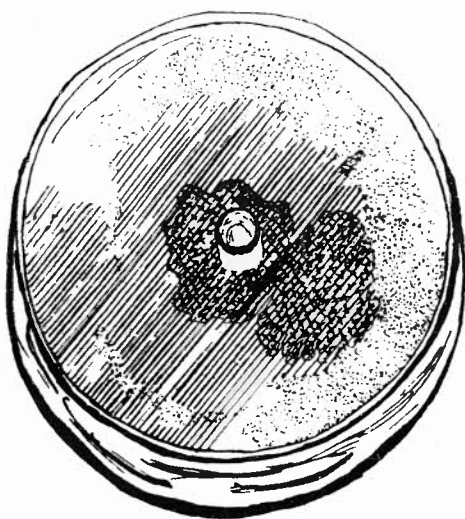
#### *Caja N° 2.*

Se tomó otro penicilindro y se colocó en el centro de la caja, se llenó de suspensión colibacilar (Cepa A). Se hace notar que en la operación, casualmente se regó sobre el medio una pequeña cantidad del líquido sembrado. No obstante se sembró el bacilo tuberculoso a una distancia prudencial no menor de 3 cms.










Fotografía N° 11.



SÍMBOLOS:

- |   |                                 |                     |
|---|---------------------------------|---------------------|
|  | {                               | Zona amarillo limón |
|  |                                 |                     |
|  | Colonias de bacilo Celi         |                     |
|  | Zona verde intenso.             |                     |
|  | Colonias de bacilo Tuberculoso. |                     |

Fotografía N° 12.

*Observaciones.*

Desde el tercer día de incubación el medio viró completamente de color. El bacilo de Koch no manifestó crecimiento aún después de un mes de cultivo.

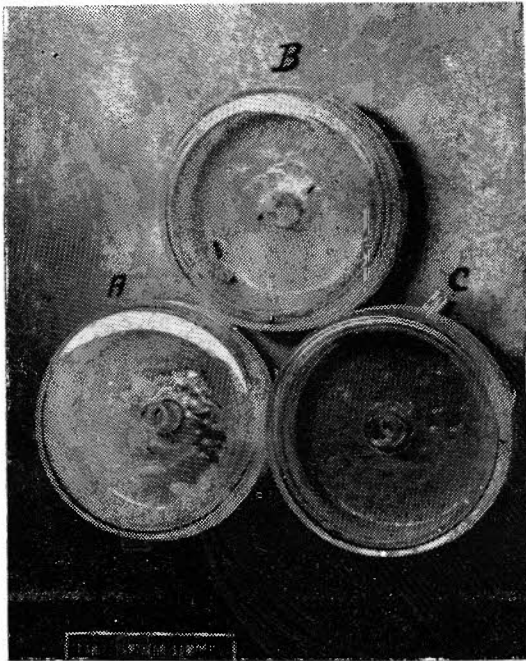
*Caja N° 3.*

Se repitió la prueba de la caja N° 2 variando únicamente la cepa tuberculosa por bacilo tuberculoso bovino

*Observaciones.*

Hubo viraje total del color del medio. Después de veinte días de incubación se notó formación de un anillo nítido, delgado y de color verde lechoso, completamente circunscrito al penicilindro. No hubo desarrollo del *Mycobacterium tuberculosis*.

Ver fotografía adjunta.



Fotografía N° 13.

A = Caja N° 1. B = Caja N° 2. C = Caja N° 3.

## CONCLUSIONES GENERALES

1. El colibacilo se desarrolla sobre medios de cultivo sólidos y líquidos, específicos para el bacilo de Koch, y en presencia de ácido sulfosalicílico en concentraciones menores de uno por mil (1 por 1.000), exalta un poco su actividad de fermentación.

2. El ácido sulfosalicílico en concentraciones que no hagan variar notoriamente el Ph del medio de cultivo, no impide el crecimiento del *Mycobacterium tuberculosis*, tipos humano y bovino. (1).

3. El bacilo tuberculoso tipo humano (H37) y el bacilo tuberculoso bovino (HB) cultivados sobre los medios de cultivo Petrof, Petrag-nani, Lowestein, Caldo glicerinado y Sauton, empleados en este trabajo, desarrollaron sus características peculiares.

4. El bacilo tuberculoso en los tipos humano y bovino, cultivado en presencia del *Escherichia coli* por siembras simultáneas o por pases sucesivos del Colibacilo sobre el Bacilo de Koch, no desarrolla sus caracteres culturales propios en los medios de cultivo empleados.

5. Todas las cepas colibacilares experimentadas: A (*Escherichia coli* comunis); B (*Escherichia coli* comunior); C (*Escherichia acidilactici*); E<sub>3</sub> (*Escherichia coli* intermedium) y F (*Escherichia coli* comunis), son más o menos activas contra el bacilo tuberculoso y se presume que la determinación de la cepa, "1.000" señalada en el trabajo de Von E. Hesse y K. Heinz, se refiere a una de las cepas más virulentas contra el bacilo de Koch.

7. El Colibacilo sembrado en medio Petrag-nani adicionado de indicador en mínima cantidad (verde de malaquita en concentración final del 1 por 10.000) hace virar el medio de un color amarillo limón hacia un color verde intenso, en una extensión variable.

El bacilo tuberculoso no hace virar el color del medio ni se desarrolla en las zonas hasta donde alcanzan los productos de metabolismo del bacilo coli.

8. Las observaciones anteriores dan lugar a considerar las posibles relaciones entre la flora bacteriana colibacilar y la incidencia y curso de procesos tuberculosos en los pacientes de T. B. C.

También permite especular sobre los riesgos potenciales de una medicación bacteriostática intestinal prolongada en relación con la infección tuberculosa.

Los puntos anteriores son el tema de próximas investigaciones.

(1) NOTA:

En la publicación de J. Lehman sobre "Patogenicidad del Bacilo Tuberculoso, por determinación de su metabolismo intermedio", consultado con posterioridad a esta investigación, se pudo confirmar la coincidencia con los resultados anotados sobre la inactividad del ácido sulfosalicílico sobre el bacilo de Koch.

BIBLIOGRAFIA

1. Hesse E. Heinz Jahnke, Karl. — Frühergebnisse einer Colibehandlung der Tuberkulose. — Therapeutische Umschau Nº 9, 139 der 1948.
2. Bergey. — Manual of determinative Bacteriology". 1948.
3. Lehmann Jorgen. — "Determination of Pathogenicity of Tubercle Bacilli by their intermediate metabolism". — "Para aminosalicylie in the treatment of Tuberculosis". The Lancet, Vol. 250 1-15-16. Ene. 1946.
4. Waksman Selman A. — "Microbial antagonisms and antibiotic substances". 1945.
5. Stitt Clough Branham. — "Practical Bacteriology, Hematology and Parasitology". 1948.
6. W. Topley. G. S. Wilson. — "Bacteriología e Inmunidad". 1949.
7. A. Calmette. — "L'infección bacillaire et la Tuberculose chez l'Homme et chez les animaux". 1928. Págs. 37 etc.