

Notes sobre la biologia i la bacteriologia del bacil tuberculós

pel Professor PERE GONZALEZ I JUAN, i LLUIS PIRONTI
DI CAMPAGNA

L'AGENT microbià de la tuberculosi va ésser durant moltíssims anys una incògnita per als investigadors. Kepler (1649), segons els uns, i Florini (1702), segons els altres, van ésser els primers a fer una menció científica de la tuberculosi, i els seguiren Silvius, Wellis, Bonnet, Stark, Baillie (1793). Bayle (1810) demostrà per primera vegada que la infecció tuberculosa no provoca sols lesions locals circumscrites al pulmó, sinó una malaltia generalitzada; un any després Laennec (1811) individualitzà els dos tipus anatòmics principals de la tuberculosi—el tipus fol·licular i el no fol·licular—i aconseguí determinar la germinació del tubercle mitjançant l'auscultació mediata de què és inventor, i amb els seus treballs brillants donà per primera vegada una descripció sistemàtica de les lesions tuberculosos i de la seva evolució. Villemain (1865) arriba a demostrar la inoculabilitat del «tubercle i de la matèria caseosa» de la tuberculosi de l'home als animals als quals produeix la malaltia experimental i amb això rebut els detractors de Laennec que assimilaven el tubercle a una forma degenerada de sarcoma. Els treballs de Martin i més tard els de Laulamié arriben a fer una primera distinció entre el tubercle veritable i el d'origen pseudo-tuberculós; els de Schuppel, Baumgarten i Lwow rebuten l'històleg Virchow i afermen les experiències de Villemain, però tots aquests i altres investigadors es troben impossibilitats de profunditzar llurs estudis sobre el particular pel fet d'ésser desconegut l'element productor. L'any 1882, ara fan cinquatre-quatre anys Robert Koch, valent-se dels mitjans creats per Pasteur i perfeccionats per ell, troba el bacil que porta el seu nom, i fa possible i fàcil la seva troballa en esputs, glàndules escrofuloses, tumors blancs i tots aquells productes

tuberculosos que provenen de l'home o dels animals, ja sigui amb la malaltia espontània o experimental, després d'haver utilitzat, abans que ningú més, els artificis de coloració que Weigert havia introduït en histologia i de seguida després mitjançant el procediment específic que donà a conèixer Erlich.

Aquest germen es podia cultivar en medis artificials i la seva inoculació en els animals de laboratori reproduïa sempre les mateixes lesions característiques de la tuberculosi espontània.

A partir d'aquest moment seria veritablement impossible de voler citar els experimentadors, que en gran nombre i pertanyents a les especialitats més diverses, estudiaren amb més o menys rigor científica la tuberculosi i especialment l'experimental, pedra angular del procés terapèutic modern.

Classificació

El *Mycobacterium tuberculosis* Lehman i Neuman, nom científic del bacil tuberculós de Koch, sembla—per l'estudi citològic dut a terme fins avui—més parent dels fongs que de les bactèries; classificat originàriament com a pertanyent a la família dels Esquizomicets, es trobà després de poc en entredit en descobrir Petrone (1884) la seva dicotomia, i més tard Metchnikoff afirmava que es tractava d'un Estreptotrix. Successivament, Schrön, Schultze i Lubasc el classifiquen com a Cledotrix o Oosporaci i fan remarcar la seva afinitat morfològica amb els Actinomicets, *actinomicetes bovis*. En aquest sentit diversos investigadors segueixen l'estudi i es produeix una digressió de Battaglia que l'anomena *Eumicetus tuberculosus*, fins arribar a l'estudi, el més curat i més recent, d'E. Roman, que l'emplaça d'una manera que podríem dir definitiva en la família dels Actinomicets.

Morfologia i estructura

El bacil tuberculós trobat a les lesions tuberculosos dels mamífers, es presenta i es descriu, generalment, com un bastonet prim, lleugerament encorbat, flexuós, immòbil i de contingut sovint granulós.

Les seves mides mitjanes són: una llargada de 0.15 a 3.5 micres i a vegades, segons Eastwood, arriba fins a 8, per un gruix de 0.3; la coloració els fa semblar més gruixuts degut que la coberta fixa el colorant amb molta intensitat.

Tant es poden trobar isolats, com en agrupacions de 2-3, com formant petites masses irregulars.

Els bacils provinents de cultiu, són més allargats, més espessos, a vegades ramificats i tenen una disposició en espiga atapeïda amb els extrems imbricats.

Un cop fixats per mètodes diversos (calor, alcohol-èter, acetona, etcètera), presenten una gran afinitat per als colors d'anilina com la fucsina, violeta de genciana, violeta de metil, etc., màximament quan la coloració es fa en calent, fet aquest que facilita granment el seu estudi.

Estudiat el germen amb coloracions vitals i postvitals, aquestes delaten la presència en el si d'aquell de certes granulacions que es tenyeixen més o menys segons el colorant emprat; aquestes granulacions foren estudiades per primera vegada per Much.

Aquest estudi portat a terme damunt gèrmens procedents de cultiu, denota en principi la presència de dos tipus de gèrmens, diferenciables amb els eosinats, pel fet de tenyir-se els uns en blau (cianòfils) i els altres en vermell (eritròfils); en ambdós les granulacions es presenten colorejades, més o menys intensament.

Després de nombrosos treballs s'ha vist que el fet depèn de la presència de protoplasma, del qual són rics els bacils que es coloren en blau mentre que en són pobres o desproveïts aquells que ho fan en vermell; millor dit, són cianòfils els bacils joves que és quan són més rics en matèria protoplasmàtica, i eritròfil els vells.

Membrana

El bacil, en la seva fase jove, té la membrana celular poc perceptible i que es coloreja feblement amb els eosinats o el blau de metilè, els quals, però, fan més patent aquella a mesura que el bacil envelleix. Quan la coloració és feta amb els eosinats passa progressivament de rosada a roig i roig violada, per fer-se després cada vegada més vermella.

Protoplasma

El protoplasma, mentre n'hi ha, té estructura homogènia, és dens i uniformement distribuït i en general no es vacuolitza amb l'envelliment de la cèl·lula; colorejant-lo amb eosinats podem veure com el de la cèl·lula jove és fortament basòfil i que perd, en envellir, poc a poc aquesta propietat, i passa de la bella coloració blava que tenia en un principi per tonalitats progressivament degradades.

Inclusions protoplasmàtiques

Quan el bacil tuberculós és jove i se'l tracta amb eosinats s'hi veuen inclusions protoplasmàtiques de coloració i dimensions variables, la forma de les quals, originàriament puntiforme, evoluciona després cap a l'ovoide o cap a la circular.

L'estudi d'aquests corpuscles ha progressat molt. E. Roman en diu corpuscles cromòfils i els divideix segons llurs propietats, en: grànuls cianòfils o no àcido-resistents; grànuls àcido-resistents iodòfils, gencianòfils o Gram +, i grànuls hiperàcido-resistents.

Hollande ha fet un estudi d'aquestes inclusions i ha classificat com a «nucleosomes» aquelles a les quals creu que se'ls pot conferir la funció de nucli del B. de K. Sembla que siguin aquests «nucleosomes» els que, apropiant-se d'una part de protoplasma, visible primer com una anella blava que poc a poc vira cap a vermella, en sobrecarregar-se de metacromatina o substància àcido-resistent, donen: primer els corpuscles de Much i per últim les formes granulars de resistència del bacil de Koch o «Renitocits».

En el bacil vell es veuen unes zones o uns espais clars que alternen amb les granulacions àcido-resistents; aquestes zones, que alguns experimentadors van anomenar en un principi «zones o grànuls indiferents», sembla que no siguin altra cosa que espais intergranulars buits, deguts a la contracció que sofreix el protoplasma en donar origen als corpuscles de Much.

Nucli

Fernberg (1900), Nakanishi (1901), Fontés (1910), Munder (1916), Kirchensteiner (1922), mitjançant mètodes especials de coloració—els uns empraren el Giemsa i els altres la coloració postvital amb el blau de metilè—, posen, segons ells, en evidència un corpuscle o grànul que anomenen nucli. Treballs posteriors de Pilbit (1926) i Roman (1930) demostren que no s'ha pogut trobar cap corpuscle que sembli tenir funció nuclear, i classifiquen els grànuls, anomenats «nuclears» pels anteriors autors, com a «formacions que recorden els corpuscles metacromàtics» i afirmen que el bacil tuberculós no posseeix ni nucli típic ni nucli espiralar.

Altres autors han treballat sobre aquesta qüestió, i podem assegurar que avui dia l'aparell nuclear d'aquest microorganisme no ha pogut ésser evidenciat, i en canvi sembla que tot succeeix com si la cromatina fos disseminada per tot el protoplasma.

Cicle evolutiu

Degut probablement a la manca de mètodes histològics i culturals apropiats a l'estudi del bacil tuberculós, el cicle d'aquest i les seves diferents fases són imperfectament conegudes, l'enllaç de les quals es basa sovint sobre hipòtesis bastides pels diferents investigadors.

Se sap que en els cultius joves es poden observar formes no àcido-resistents; se sap igualment que sota influències diverses el bacil de Koch pot vegetar en forma ramificada, i en filaments que presenten extremitats maçudes; també se sap de la discutida existència d'una forma filtrable.

Bezançon i Philibert (1914) han descrit que al centre dels cultius joves, es troba una substància reticulada, cianòfila que per certs autors correspondria al «simplasma» de Lönhis.

Vaudremer (1927) admet que les colònies microbianes es desenvolupen a partir de la substància cianòfila trobada per Bezançon i Philibert, composta de granulacions no àcido-resistents, isolades les unes de les altres i sovint constituïdes per dos semicercles separats per un eix interpolar. Sembla que aquests corpuscles són els que darien els elements bacillars, en adquirir a poc a poc l'àcido-resistència i disposar-se després en forma de cadenetes o rosari per constituir el bastonet àcido-resistent, de tal manera, que el bacil resta format per diversos grànuls que tenen llurs eixos interpolars disposats l'un com a perllongament de l'altre. A mesura que els bastonets augmenten els elements de retícul cianòfil es fragmenten i desapareixen.

Segons Reensterna (1926) el bacil de Koch donaria lloc a la naixença de granulacions molt fines de les quals derivarien unes formes voluminoses i uns filaments fortament tabicats; aquests en disgregar-se alliberarien novament grànuls que donarien lloc a la formació de bacils no àcido-resistents, però aptes a tornar-s'hi més tard. Roman, en parlar de les formes compactes i maçudes de les quals acabem de fer esment, diu que no són altra cosa que impureses.

Kahn (1929), seguint l'evolució en microcultiu, troba que el bacil àcido-resistent dóna naixença a quatre segments ovalats àcido-resistents; aquests es subdivideixen en cocus que es tornarien a dividir en elements més petits; un cop reduïts, aquests elements petitíssims, s'aglutinen i, a l'entorn de la massa formada apareixen filaments molt tènues no àcido-resistents que, en engruixir-se, s'hi tornaran ràpidament.

Roman (1930), partint també del bacil, troba que aquest, en

condicions favorables, pot evolucionar conservant la forma original i reproduir-se per escissiparitat durant un temps bastant llarg i creu també que per processos i en circumstàncies no conegudes, el bacil de Koch, donaria lloc a formes filtrables que poden, en condicions favorables i passant per fases intermèdies mal conegudes, regenerar la forma primitiva.

Segons el mateix Roman, d'aquest cicle pot derivar-ne un altre durant el qual, en condicions mal definides, el bacil de Koch no es divideix, sinó que s'allarga i es ramifica transformant-se en la forma gegant, i els filaments així formats es poden dividir en segments bacil·lars, encara que també podria ésser que certs tipus donessin lloc a elements reproductors; però—segueix dient Roman—, aquests fets, a l'hora de llur publicació, no els tenia encara prou comprovats.

Hollande (1932), en els seus recents treballs sobre aquest particular, creu, també, haver pogut establir el cicle del bacil tuberculós. Per tal de descriure'l pren com a punt de partida, el bacil de Koch àcido-resistent i proveït de corpuscles de Much, o sigui tal com el trobem a les lesions tuberculoses, al qual anomena «forma durable».

En aquesta fase, el bacil està generalment desproveït de protoplasma, i està constituït, la major part del temps únicament per una cèl·lula morta que poseeix una membrana més o menys àcido-resistent. A l'interior del cos microbià es veuen corpuscles hiperàcido-resistents i gencianòfils que anomena «Renitocits». Aquests deriven dels corpuscles de Much i es poden conservar, segons experiències d'Arloing i Doufour durant molt de temps a la temperatura del laboratori.

Des de la seva formació el renitocit està envoltat d'una petita zona de protoplasma fortament impregnada d'una metacromatina cianòfila i per una membrana que es torna progressivament àcido-resistent, i que constitueix una cèl·lula que en la seva petitesa varia tan notablement de grandària que n'hi ha que arriben al límit de la visibilitat microscòpica i, segons Lucksach ha demostrat, poden passar a través del porus de la bugia Chamberland L. 3, la qual cosa mou a creure en la possibilitat que aquests elements siguin els progenitors de l'ultravirus tuberculós.

A partir d'aquests renitocits neixen els elements de forma corpuscular, que en engrandir-se deriven ràpidament cap a la forma bacil·lar i esdevenen rics d'un protoplasma dens i basòfil proveït de «nucleosomes» o grànuls que es carreguen de metacromatina originàriament cianòfila i més tard eritròfila.

El bacil en aquesta fase, sovint no àcido-resistent, es multiplica per divisió transversal, i és necessàriament imprescindible perquè es

Quadres - Resum de les principals característiques dels diversos tipus de B. tuberculós i dels Pseudotuberculosos

	Bacil Humà	Bacil Boví	Bacil Aviar	Bacil de l'animal de Sang Freda	Pseudotuberculosos
Morfologia	Prim. $\pm$ 3 micres de llarg	Curt i gruixut, $\pm$ 1 micra de llarg	Prim. $\pm$ 3 a 5 micres de llarg		Variable
Temperatura de creixement	30 a 41°; òptima 38°	30 a 41°; òptima 38°	28 a 45°; òptima 40°		Òptima 37°
pH (Observat en medi glicerinat al 4 %)	7,4 a 8; òptim 7,7	5,8 a 6,9; òptim 6,4	6, 2 a 7,7; òptim 7,2	Òptima 25° 5, 2 a 7,7; òptim 7	Òptim 7,5
Resistència al SO_2 , H_2 (Temps de contacte 30 minuts)	Resisteix concentracions fins del 30 %.	Resisteix bé concentracions del 30 %.	Resisteix bé, però no amb la intensitat dels B. Humà i Boví.		Resisteix concentracions dels 5 i 10 %; concentracions superiors són netament nocives.
Resistència a l'àcid acètic (Temps de contacte 30 minuts)	No resisteix concentracions del 5 %.	No resisteix concentracions del 5 %.	Resisteix concentracions del 5 %; no resisteix concentracions del 10 %.		Resisteixen concentracions del 5 i 10 %.

Manera de desenvolupar-se en els medis de Cultiu (Topley, Besson)

	Bacil Humà	Bacil Boví	Bacil Aviar	Bacil de l'animal de Sang Freda	Pseudotuberculosos
Agar ordinari	No creix	No creix	Cultiu pobre, parcialment confluent, difús, transparent i amb superfície finament granulada.	Cultiu moderat, semiconfluent, sobresortint, irregular, superfície llisa o granulosa.	Cultiu abundós, confluent, sobresortint, irregular, pigmentat, superfície llis-granulosa o vermicular.
Agar glicerinat 5 %	Creix bé, sovint cultiu luxuriant, generalment confluent, sobresortint, blanc-cremós; superfície finament granular, escamosa o arrugada.	Cultiu pobre, colònies lleugerament granuloses; sovint forma un vel difús i confluent.	Sovint creix com el bacil humà, però quasi sempre en forma més abundosa. Superfície de color blanc-cremós.	Dóna un cultiu abundós, amb superfície blanc-crema.	Creix en forma semblant a com ho fa en el medi a base d'ou i glicerinat.
Brou ordinari	No creix	No creix	No produeix enterboliment del medi. Creix en superfície, forma un lleuger dipòsit viscos membrano-granulós que es disgrega parcialment en agitar.	Es desenvolupa en forma semblant al B. tipus Aviar.	No produeix enterboliment del medi, forma un vel superficial, sec, pesant, escamós o granulós, sovint pigmentat i un sediment viscos membrano-granulós que es desintegra parcialment en agitar.
Brou glicerinat 5 %	Vel superficial gruixut, blanc o de color crema, arrugat, opac i grimpant. No produeix enterboliment al medi. Forma un lleuger dipòsit granulós o escamós.	Vel superficial prim, blanc-grisenc, de superfície lleugerament nodular en alguns indrets. No produeix enterboliment del medi; forma un sediment lleugerament granular.	De vegades es desenvolupa en forma d'un vel que, en forma de cordons, va del fons a la superfície del medi. Altres vegades sols es produeix un dipòsit granular al fons. No creix en superfície.	No produeix enterboliment al medi, però forma un vel gruixut que, en forma de cordons, va des del fons a les parets del tub. No creix en superfície.	Pel·lícula gruixuda, irregularment granulosa, a la superfície i en forma d'escames. Cultiu de color blanc-grogüenc o pigmentat, escampat per la part superior del medi. No produeix enterboliment del medi i si un dipòsit groller al fons del tub.
Sèrum coagulat	Cultiu prim, difús, confluent, groc grisenc; creix amb superfície finament granulosa.	Com l'humà, sols que el cultiu és més pobre, sec i escamós.	Igual que el bovi	Cultiu moderat, confluent, sobresortint, superfície finament nodular.	Cultiu abundós, sobresortint, confluent, sovint pigmentat, creix irregularment, i té la superfície llisa o nodular.
Sèrum coagulat glicerinat al 5 %	Cultiu molt abundós, sobresortint, confluent, groc o groc daurat, creix amb superfície grollerament granulosa, irregularment engruixida.	Igual que el B. humà	Cultiu abundós, sobresortint, confluent, groc o groc daurat, amb superfície cremosa o llisa.	Creixement una mica més abundós que en sèrum sol.	Creixement similar al sèrum sol, sols que és una mica més abundós.
Patata gliceritada	Cultiu luxuriant, sobresortint, confluent, color crema, superfície nodular o vermicular.	Cultiu pobre, prim, difús, grisenc.	De vegades igual que l'humà, però usualment més difús, color semblant i superfície lleugerament nodular.	Cultiu difús, sobresortint, color cremós, superfície grollerament granular i en forma vermicular.	Cultiu abundós, sobresortint, sovint pigmentat, superfície grollerament granulosa i d'aspecte com de crostes de pa.
Patata biliada	Si s'ha utilitzat fel humà, el cultiu és afavorit considerablement. El fel de bou el retarda.	El cultiu és afavorit pel fel de bou i retardat pel fel humà.			
Medi de Dorset a base d'ou	Cultiu pobre lleugerament sobresortint, gris-grogüenc, amb superfície finament granular.	Cultiu per l'estil de l'humà, sols que és més pobre.	Similar a l'humà, sols que la superfície és més llisa.	Cultiu abundós, confluent; superfície relativament llisa, sovint semblant a la mantega de vaca.	Cultiu abundós, confluent, sovint pigmentat, sobresortint, superfície opaca, seca, finament granular i irregularment amuntegada.
Medi a base d'ou i glicerinat	Cultiu molt abundós, sobresortint, confluent, groc-grisenc, superfície grollerament granulada, irregularment nodular.	Creixement similar al que s'obté amb el medi a base d'ou.	De vegades igual que l'humà, però habitualment molt més abundós; superfície llisa, color crema, groguenc o lleugerament pigmentat.	Cultiu moderat lleugerament, sobresortint, confluent, superfície brillant i finament granular.	Cultiu luxuriant, sobresortint, groc, pigmentat o de color roig-maó; superfície grollerament granulada i com a crostes de pa.
Medis sintètics tipus Sauton	Cultiu molt abundós, blanc-grogüenc. Estrictament superficial, formant vel gruixut i grimpant, molt arrugat. El medi resta sempre completament transparent.	Igual que l'humà	Cultiu abundós, vel prim més o menys uniforme, d'un color groguenc i d'aspecte cremós, poc grimpant.		

Receptivitat Natural i Poder Patogen

	Bacil Humà	Bacil Boví	Bacil Aviar	B. Á. Sang Freda	Pseudotuberculos
Receptivitat natural	Home, porc, simis, gossos i llores.	Bòvids, òvids, suïds, gats, simis i home.	Aus i porcs.	Serps, sargantanes, tortugues, grànols, peixos.	No són patògens.
Poder patogen en:					
Home	<i>Patogen</i>	<i>Poc patogen</i>	<i>Excepcionalment patogen</i>		
Bou	<i>Poc virulent</i>	<i>Molt virulent</i>			
Vedell	Quasi sempre dona lloc a tuberculosi localitzades.	En qualsevulla dosi i inoculat per qualsevulla via produeix una greu malaltia.	Generalment no és virulent per als bòvids.		
Cabra	0,05 grs. per via subcutània determina lesió local sense generalització.	0,05 gr. per via subcutània determina lesions progressives i la mort en 1 a 3 mesos.			
	<i>Poc virulent</i>	<i>Virulent</i>	<i>Poc virulent</i>		
	Per injecció intramamària produeix infecció local amb induració pas-satgera dels ganglis mamaris (Cal-mette et Guérin).	Per injecció en el canal lactífer, pro-dueix primer lesió local i més tard mamitis greu, generalització ràpida amb extensió pulmonar de resultats mortals (Calmette et Guérin).	La injecció per via intravenosa pro-dueix lesions als ganglis del pulmó, diafragma i melsa (Karlski).		
	10 cgrs. de germen per via digestiva sols produeixen lesions als ganglis. (Damman, Müssmeier, Dinwiddie, Ravenel, Beck).	10 cgrs. per via digestiva produeixen la mort en 44 dies (D. M. D. R. B., etc)			
Cobai	<i>Molt virulent</i>	<i>Molt virulent</i>	<i>Poc virulent</i>		
(Utilitzat per diferenciar el ti-pus Aviar dels mamífers (Humà i Boví))	Sia la que es vulgui la dosi i tècnica d'inoculació.	Per via intracutània determina un procés ràpid.	Determina quasi sempre lesions locals. En grans quantitats determina lesions característiques.		
	Per via intracutània es determina un procés lent.		El pas repetit per cobai no augmenta la seva virulència.		
	10 mgrs. per via subcutània produeixen un procés generalitzat i la mort del cobai en 4 a 8 setmanes i es troba a la necròpsia els ganglis caseificats i la melsa i el fetge amb grans superfícies necròtiques (Cobbett).		10 mgrs. per via subcutània no pro-dueixen—generalment—lesions; en cas de produir-ne són locals i com a màxim els ganglis poden trobar-se hiperhèmics i la melsa augmentada i congestiva (Cobbett).		
Conill	<i>Virulent</i>	<i>Molt virulent</i>	<i>Virulent</i>		<i>No patògens</i>
(Utilitzat per diferenciar el ti-pus Humà del Boví)	0,001 mgr. per via intravenosa no de-termina lesions, i—cas de produir-ne alguna als pulmons o ronyons—no té evolució generalitzada.	0,001 mgrs. per via intravenosa a un conill de 1.500-2.000 grs. de pes, de-termina una tuberculosi generalit-zada progressiva i mortal.	Encara que no tant com l'humà i el bovi.		Poden determinar una caseificació generalitzada.
	A dosi de 1 mgr. no produeix tampoc —habitualment—generalització. Les alteracions macroscòpiques de ve-gades manquen totalment, i d'al-tres es limiten als pulmons.	Les lesions abunden, i es presenten en els ganglis axil·lars i inguinals tuber-cles de volum variable; molts nò-duls pulmonars; la melsa molt aug-mentada amb infiltració i tubercles; el diafragma, budell i peritoneu són atacats.	Ataca greument el conill al qual de-termina una tuberculosi tipus Yer-sin.		En aquest cas es diferencia dels B. tuberculosos humà, aviar i bovi fent inoculacions en sèrie, puix que sols els B. T. són trans-missibles en sèrie.
	Inoculat a la cambra anterior de l'ull dona lloc a la formació de nòduls a penes caseificats i que tendeixen a una guarició espontània. (Linck i Schieck)	La inoculació a la cambra anterior de l'ull a dosis petítissimes determina la caseificació i pèrdua de l'ull en breu termini, seguida de generalit-zació i mort.			
Cavall	<i>Virulent</i>	<i>Virulent</i>	<i>Excepcionalment virulent</i>		
Simi	Ambdós bacils determinen lesions generalitzades. Algunes espècies superiors són particularment sensibles al tipus Boví (Eastwood, Dinger, Shidh).		<i>Excepcionalment patogen</i>		
Porc	<i>Poc virulent</i>	<i>Poc virulent</i>	<i>Poc virulent</i>		
	La inoculació per via gàstrica subcu-tània, intraperitoneal, intravenosa, no determina lesions. I cas de pro-duir-se'n es presenten en forma de petits focus caseosos pulmonars.	Es comporta com el tipus humà, en-cara que infecta amb més facilitat.			
Rata	<i>Poc virulent</i>	<i>Virulent</i>	<i>Molt virulent</i>		
	1 mgr. de germen en la safena no pre-senta cap lesió durant 4 o 5 dies. (Tromsdorf, Beek, Peters)	1 mgr. de germen en la safena deter-mina ràpidament lesions generalit-zades i especialment al pulmó.			
	La inoculació subcutània sol donar lloc a la formació d'un abscess local —que es guareix més tard—i una lleugera caseificació ganglionar.	La inoculació subcutània mata en 3 o 4 mesos i es troben a la necròpsia tubercles pulmonars i abundants bacils a la melsa.			
Aus	<i>Poc o gens virulent</i>	<i>Poc o gens virulent</i>	<i>Molt virulent</i>		
(El colom i la gallina són uti-litzats per diferenciar el tipus dels mamífers de l'Aviar)	Es troba sovint a la tuberculosi del lloro.				
	10 mgrs. per via intraperitoneal, no produeixen —habitualment—lesions macros-còpiques i en cas de produir-ne es limiten a un abscess local (Cobbett).		10 mgrs. per via intraperitoneal pro-dueixen un decaïment general molt ràpid i la mort en uns 3 mesos; a la necròpsia es troben abundosos tu-bercles i superfícies caseoses.		

pugui fer aquesta reproducció escissípara que l'element es trobi en aquest estat, jove, i ric en protoplasma; facultat aquesta, que es va perdent a partir del moment en què per envelliment resta sense protoplasma.

A partir de les formes vegetatives que tenen naixença d'aquesta manera, i en les quals es van elaborant els «metacromatinosomes» o corpuscles de Much—el procés de la formació dels quals ja hem explicat en altre lloc d'aquest escrit—, que com sabem es fan progressivament àcido-resistents, a partir d'elles es torna a produir aquella forma «durable» de què fèiem esment fa un moment, o sigui el bacil de Koch pròpiament dit de membrana senzilla i més o menys fortament àcido-resistent, òriginàriament homogènia, més tard granulosa i desproveïda de protoplasma. Els grànuls «renitocits» seran els elements que, com acabem de consignar, tornaran a començar aquesta modalitat del cicle.

Segons el mateix Hollande, en certes condicions desfavorables del medi, les formes vegetatives del bacil de Koch es transformen en elements coccoides que són l'origen de formes ramificades de *Micobacterium tuberculosis*, estat al qual correspon, probablement, el tipus *Sclerotrix* estudiat per Metnickoff.

Aquestes formes ramificades, estan constituïdes per nombrosos filaments de gruixària diversa, i poden ésser a vegades molt allargats i tabicats, i d'altres pediculats a la base i reinflats en forma de maça al cim. Els filaments tabicats són aptes, en certs casos, a donar lloc a la naixença d'elements microbians molt reduïts, que ulteriorment es transformen en bacils de Koch. Pel que fa referència als elements maçuts, sembla, segons hipòtesi d'Hollande, que són aparells sexuats «gàmets». La conjugació sembla produir-se per unió de dues maces, que encara que morfològicament apareguin isògames, per tenyiment s'evidencia la seva heterogamicitat, pel fet d'ésser sempre l'una d'elles cianòfila i l'altra eritròfila. Els nucleosomes dels dos gàmets sembla que es copulen al punt de contacte de les membranes i que es forma l'òvul al si d'un oosporangi eritròfil.

D'aquest element sortirà un fi filament microbià que en multiplicar-se donarà lloc a les formes pròpies del bacil tuberculós; abans d'arribar a la forma durable aquest element passarà per una fase rica en protoplasma desproveïda de «renitocits» i com que sols té paranucleosomes o metacromosomes, pot reproduir-se per escissiparitat transversal. El germen en aquest estat, segons Hollande, donaria en medi Saburaud un cultiu abundós i apte per a reproduir-se ràpidament per repicatge cada 5 o 6 dies.

Aquest mateix element microbià, no o gairebé no àcido-resistent, seria fàcilment emulsionable en solució fisiològica.

VARIABILITAT DEL BACIL TUBERCULOS

Com tots els altres punts referents al bacil tuberculós, aquest de la variabilitat o millor de la pluralitat de bacils ha estat sempre molt debatut. Quan es va descobrir el bacil, en veure que es trobaven gèrmens semblants, de característiques morfològiques i biològiques fortament paregudes i que produïen lesions de tipus gairebé idèntic, ningú no va dubtar sobre la seva unicitat. No és fins més tard i quan la investigació i la recerca del bacil de Koch comença a apartar-se de les generalitats i s'estén a totes les espècies animals, que veiem com Dubard i Bataillon i Terre (1897) troben en les perques i carpes, bacils de característiques i propietats molt semblants a les del bacil de Koch. Aquests autors creien haver descobert el bacil específic dels animals de sang freda; aquest bacil, segons treballs d'investigadors posteriors és transmissible a la granota, i la sargantana, mentre que, els peixos en general, hi són més o menys refractaris, i els insectes i especialment els escarabats moren ràpidament; en canvi, els animals de sang calenta com el cobai i el conill són refractaris a aquest bacil.

Més sort va tenir Silbey (1895), qui va isolar de la lesió d'una llieta un altre bacil àcido-resistent molt semblant a l'anterior; aquest bacil és transmissible a tots els animals de sang freda, i es considera com a veritable tipus del bacil tuberculós d'aquests animals, mentre que el de Bataillon i Terre és considerat com un paratuberculós. Aquest germen determina al conill una caseïficació total i al cobai la formació de veritables tubercles; els ocells, gossos, gats, les rates i els ratolins són refractaris a l'acció d'aquest bacil.

Hi ha, finalment, entre aquests bacils d'animals de temperatura variable el que s'ha trobat a la granota, i que és patògen per a aquesta, la serp i la sargantana, i que determina al conill la formació de nòduls; el cobai i la rata, en canvi, hi són refractaris.

La variabilitat del bacil de Koch als animals de temperatura constant també ha estat objecte d'estudi. La primera espècie, i més que espècie pot dir-se que fou variant, acceptada, és l'aviar; la unicitat, o sigui la creença que l'agent fos el mateix que el de la tuberculosi dels mamífers, va ésser combatuda a partir del moment en què Straus i Würtz fracassaren en l'intent d'infectar aviram amb esputs tuberculosos; obtingueren el mateix resultat Esser, Perroncito, Nocard, i tot i

que les experiències de Zschokke, Behring, Cadiot, Gilbert i Roger, Arloing, Courmont i el mateix Nocard ens parlen de casos rars en els quals el bacil aviar ha estat trobat en processos tuberculosos del porc i del cavall, o viceversa, o sia que bacils humans o bovins han estat trobats en casos de tuberculosi de l'aviram, sembla justificada una distinció, no d'espècie precisament, però sí de tipus, creada com direm després, per una perllongada adaptació al medi, la qual distinció justifica al mateix temps els treballs d'aquells altres autors així com les troballes fetes per Straus, Nocard, Löwenstein i L. Rabinowitsch de bacils tipus aviar a l'home; de Rabinowitsch i Fischel que el troben als simis, San Felice, Kruse i Panşini als bòvids, i Weber i Bofinger i O. Bang al porc, i altres. Amb tot i això, però, aquesta diferenciació no pot ésser presa d'una manera absoluta i definida, la qual cosa es desprèn també de l'intent d'infecció de mamífers amb bacils aviars, punt en què han fracassat nombrosos autors. Cal consignar, també, que el lloro és més sovint infectat pel bacil tuberculós tipus humà que per l'aviar.

Pero les grans discussions sobre la pluralitat del bacil de Koch no es van aixecar fins després dels treballs de Th. Smith (1896-98), que parlen de la dualitat del bacil dels mamífers en els quals distingeix dos tipus, un que ataca l'home i que anomena tipus humà, i l'altre als bòvids i animals en general, al qual anomena tipus boví. Aquesta teoria admesa de bon començament amb reticències semblava que devia restar consagrada amb la comunicació de Koch i Schultz, feta el 1901, en què no sols s'admetia les teories de Smith, confirmant les diferències bàsiques entre els dos tipus, sinó que s'hi enunciava la greu asseveració que el bacil boví no atacava l'home, motiu pel qual fóra inútil de prendre mesures de previsió contra un possible contagi de la tuberculosi dels bòvids a l'espècie humana.

El fet va ésser molt diversament acceptat; fou fortament combatut per Arloing i els seus deixebles que sostingueren la teoria dita «unicista», o sigui la d'un origen comú per a tots els tipus de bacil tuberculós.

Els investigadors han continuat dividits en els dos bàndols, en cada un dels quals abunden els treballs de tots els caires que volen provar i deixar establerta la teoria de què són partidaris.

Podem distingir principalment, a part de Smith, pels dualistes Frothingham (1897), Dinwiddie (1899), Koch i Schultz, Kossel, Weber i Heuss Park i Krumwiede, i pels unicistes Arloing, Courmont, etc. Els primers ens parlaren de diferència en els medis de cultiu com el

brou i l'ou glicerinat, i consignaren que en el primer medi el cultiu es produeix per al tipus humà en forma d'un vel luxuriant, molt replegat i de gruix uniforme, mentre que el boví el dona migrat, reticulat i de gruixos diferents; en el medi a l'ou glicerinat el bacil boví es desenvolupa molt lentament, formant a la superfície del medi una capa granulosa minsa i a vegades al principi es veuen sols colònies isolades, el cultiu es veu humit i pot arribar fins a tenir la superfície viscosa; mentre que el bacil humà dona sempre cultiu abundós i ràpid, i el medi es recobreix en breu temps d'una capa uniformement gruixuda i berrugosa; el cultiu és friable i difícil d'emulsionar i d'aspecte sec.

Entre els altres medis que han estat preconitzats per a la diferenciació dels dos tipus, citarem la patata biliada preparada segons Calmette i Guérin.

Sobre diferències morfològiques, Smith, Dorset, Kossel, Weber i Heuss ens diuen en llurs treballs que troben que el bacil boví és més curt, sovint, gairebé de forma coccoide, i que es tenyeix més uniformement que l'humà, que és més llarg i més prim, i fàcilment decolorable; però altres autors no reconeixen aquestes variacions com a sistemàtiques o constants. Park i Krumwiede, estudiant aquest punt han trobat que aquests caràcters varien amb els medis de cultiu, puix que no els troben en gèrmens que ja de temps hagin estat isolats i cultivats en medi a l'ou glicerinat. Es pot dir, com a resum, que les diferències morfològiques són molt menys fidels que les corresponents a la manera de cultivar i a l'aptitud patògena.

Seguint exposant les principals diferències observades per als dos tipus bacillars consignarem que Th. Smith i més tard Bang, Lewis, La Comissió Anglesa, Park i Krumwiede, i Grund han observat una diferència en la reacció del medi de cultiu, la qual, per al bacil boví, en un principi és àcida i es transforma poc a poc en alcalina, mentre que per a l'humà l'acidesa inicial tot i decreïxer en principi, després torna a pujar; però aquesta característica que en un principi va prendre molta importància n'ha perdut bastant en notar-se irregularitats en certes varietats.

La diferència en les tuberculines és tan petita que ha estat força vegades utilitzada com a argument a favor de la teoria unicista. Dels estudis de Wolbach, Ernst, etc., resulta que no hi ha diferència notable en l'activitat de la tuberculina humana i bovina per a l'espècie humana, però sí que n'hi ha per a la bovina, en la qual, segons estudis realitzats per Bang, la reacció obtinguda amb la tu-

berculina bovina és molt més marcada que la que dona la tuberculina humana.

En resum: la qüestió del tipus de bacil tuberculós, després de més de quaranta anys, gairebé no s'ha aclarit gens; les teories no han mancat, però la inestabilitat dels caràcters diferencials fa creure, i avui és generalment admès: que totes les tuberculosis són degudes a bacils l'origen dels quals és comú (*b. tuberculosae mammaliium*), que determinen a l'organisme lesions semblants, que es cultiven, generalment, en medis i forma anàloga, però que posseeixen propietats biològiques i de virulència i un poder infectant variable, i que ofereixen caràcters morfològics i específics diferents segons les modificacions que sofreixen per efecte d'una llarga adaptació als medis i segons el temps, més o menys llarg, de permanència als organismes dels diferents grups animals. S'han format tipus no netament delimitats, sinó relligats per una sèrie de tipus dits «Intermediaris» que permeten passar de l'un a l'altre. Molts investigadors hi han treballat i molts hi treballen, i encara que les conclusions que han pogut treure són molt poques en relació a les seves nombroses aportacions, aquestes no han resultat inútils, puix que han demostrat la variabilitat d'un bacil que era considerat com una unitat microbiana de caràcters fixos i virulència constant. Avui s'admet, generalment, l'existència de variants específiques i de tipus «intermediaris»; però no es podran acceptar aquestes teories categòricament fins a haver-les confirmat per mitjà de tots els medis de què disposa l'anàlisi bioquímica i el mètode experimental.

Com a resum de tot el que hem dit, vegi's pàgines intercalades entre les 8 i 9.

DISSOCIACIO DEL BACIL TUBERCULOS

A últims del segle passat i coincidint amb els treballs que hem esmentat en parlar de la pluralitat de les espècies de bacil tuberculós, va començar a parlar-se, per als gèrmens en general, del que llavors s'anomenà «variació natural». Els treballs que en parlaven, encara que esporàdics i de resultats en aquells temps veritablement sorprenents, començaren a confirmar-se mútuament, i anaven contra el parer general que es fonamentava damunt la base bastida per R. Koch, els postulats de la qual, sobre la fixesa i invariabilitat de les espècies microbianes, eren defensats per molts investigadors i pel mateix Pasteur.

Alguns d'aquests, com per exemple, Naegeli, Buchner i el mateix Pasteur, si bé es trobaven davant de fets, com el de l'atenuació dels bacils del còlera aviar, *B. Antracis* i del virus ràbic, no s'entretien a esbrinar per què succeïa aquesta atenuació, quin era el seu mecanisme. S'acontentaren d'admetre'l tal com era, i sols es preocupaven d'utilitzar els avantatges que derivaven d'aquests fets; i, no és fins a Lehman i Neuman (1896) que es començà l'estudi sistemàtic amb els notables treballs d'aquests investigadors sobre la variabilitat dels micrococs, *B. pneumoniae*, *Acidi Lactici*, etc.; després d'ells torna a haver-hi una llarga etapa fins a Neusser (1906) i Massini (1907), que ens parlen del seu bacil Coli «mutabile», i Baerthlein (1912), que tracta un gran nombre de gèrmens, dels quals estudia les variacions morfològiques, bioquímiques i cromogèniques.

A poc a poc aquests treballs, es van multiplicant, prenen cos, tenen una orientació que comença a delimitar-se amb Weil i Felix (1907), els quals troben, en el curs de llurs treballs, que gèrmens procedents d'un mateix cep presenten notables variants antigèniques, i que aquestes estan íntimament lligades a certes diferències observades en la forma de desenvolupar-se dins els medis de conreu i així tenim les que ells anomenaren antígens O i H del seu famós *Proteus* X19, els caràcters de les quals són ben diferents; per últim Arkwright (1921), en el seu treball sobre el grup colitíficdisentèric ens confirma aquests fets i ens classifica aquelles diferències de conreus segons l'aspecte macroscòpic de les colònies de les quals anomena «S» aquelles que tenen contorns regulars i superfície llisa, i «R» aquelles de contorn irregular i superfície rugosa; estudia a més les propietats de cada tipus i les morfològiques, bioquímiques i serològiques. Aquest estudi fou completat per De Kruif (1921) en deixar consignades les variabilitats de la virulència.

Després un estol d'investigadors confirma aquestes propietats i en troba de noves, com també medis de dissociació, etc. Així veiem Mac Conway que treballa sobre l'*estreptococ*, Griffit el *pneumococ*, Reuman, Topley i Ayrton l'*enteritidis*, Bruce White el grup de les *Salmonelles*, Julianelle el bacil de Friedlander, Hadley el grup de les *Brucellès*, Soule el *subtilis*, *megaterium*, *mesentericus*, etc.

El bacil tuberculós també ha estat objecte d'estudi. Entre els investigadors que l'estudiaren durant el segle passat, podem citar com a primer Gasperini (1895), qui el creu intercanviable amb l'*Actinomyces alba*, seguit de Nocard (1898) que, com dèiem en el capítol anterior, observà la variació del bacil humà en aviar, el barceloní Fer-

ran qui afirmà que els bacils tuberculosos varien de virulents a sapròfits i viceversa, i Bang (1908), que veu la transformació del tipus boví en aviar. Però no és fins als treballs de Baerthlein i Tojoda (1913) que comencem a trobar treballs que podríem dir que tenen base, o que són científicament admissibles, puix que a la inversa dels esmentats anteriorment, el d'aquests autors és el primer treball que veiem confirmat per altres investigadors com és ara Goldmeister (1921) que torna a obtenir la dissociació espontània en colònies tipus R i S del bacil tuberculós de la tortuga.

Sobre aquesta base apareixen nombrosos treballs que no aporten cap novetat notable fins que arribem als treballs de Petroff i els seus col·laboradors Biondi, Stwenken i Win (1927-33) qui demostren clarament que la formació de les colònies tipus R, S, Ch. i F.S. (rugoses, llises, cromògenes, i lleugerament llises, respectivament), del bacil tuberculós també guarda relació amb les propietats bioquímiques, serològiques i patogèniques.

Aquests, com tots els fets en general, són discutits i, naturalment, admesos pels uns i refusats pels altres. El nombre d'investigadors amb el desig d'aclarir-ho abunda i entre ells podem distingir els treballs de Kraus, Albert i Gebberg, Necktadimenko, Odina, Syssak i Auguenitski, Tzekowitz, Begbià, Doan, Seibert, Long, Morley, Negre, Valtis, Van Deynse, Saenz, Costil, Armand Delille, Schieder, Birkhaug, que es preocupen d'aquests fets i avui dia ja és admès per tothom la dissociació freqüent del bacil de Koch en les seves variants R. i S.

No és tan concordant el parer respecte a la relativa avirulència de la variant R i l'extrema virulència de la S propugnada per l'escola de Petroff, que arriba a admetre una virulència per la varietat llisa del B.C.G., fet que ha estat formalment desmentit pels treballs posteriors basats sobre llargues experiències de Birkhaug, Purns, Saenz, Van Deynse i col·laboradors que en tres anys no han pogut evidenciar cap diferència remarcable entre la virulència del tipus R, i la del tipus S. del B. C. G.

Aquestes assercions de Petroff i les contradictòries interpretacions de diversos autors sobre aquest fet, sembla que són degudes a una tècnica defectuosa o a un apressament en la interpretació dels resultats els quals han donat, a vegadés, casos de veritable confusió en la interpretació de la classe de colònies de què es tracta, error molt possible si es té en compte el gran nombre d'elements intermedis que se solen trobar i la manca de fixesa dels caràcters morfolò-

gics dels ceps humans, bovins i aviars, que es dissocien espontàniament en colònies tipus R, S, i Ch, dissociació que es porta a terme especialment *in vivo* i que és menys freqüent *in vitro*.

Per altra part sembla que totes les races tenen tipus dominants; en el bacil aviar sembla que domina la variant S, en canvi, les variants Ch i R hi són relativament rares; en el bacil humà i boví són més rares la Ch i S i en ells el paper de dominant escau a la R; totes aquestes varietats, però, poden fàcilment passar de l'una a l'altra si les condicions ecològiques ho permeten.

Les variants Ch i S dels bacils humans i aviars es diferencien de la variant R per la seva evolució difàsica en els medis glicerinat. El seu desenvolupament es caracteritza en aquests medis per un creixement inicial, lent, difús a tota la massa del líquid, seguit més tard d'una clarificació amb formació d'un vel uniformement llis i cremós; mentre que la varietat R dona en aquests mateixos medis un creixement molt ràpid, i té un vel arrugat, clivellat i fràgil.

L'absència de glicerina en els medis de cultiu determina en la varietat Ch i en la S un creixement difús i abundós però sense formació de vel. Un excés de glicerina retarda notablement el creixement del bacil tuberculós.

Les variants Ch i S creixen a la temperatura del laboratori (20-30°) en medi sòlid i líquid, mentre que la variant R sols creix de 37 a 40°. Birkhaug ens diu, a més, que cap de les variants Ch, R o S no poden desenvolupar-se en anerobiosi estricta tant si el medi és sòlid, com líquid, glicerinat o no.

Els valors dels pH òptim i límit també són diferents per a cada variant; així veiem com per a la S el pH òptim és el neutre o l'àcid i que els límits per a aquesta i la Ch són pH 4 i 9, mentre que per a la R és neutre o alcalí i que en aquest cas els pH límits són respectivament 5.5 i 8.

La formació de vel manté el mateix límit per a les varietats R i S i, per tant, no es produeix ni per dessota de pH 5.5 ni per damunt de pH 8.

La reacció del medi Sauton després de 10 setmanes a 37°5 dona per al bacil aviar i varietat Ch i S reacció alcalina, mentre que és àcida per a la variant R. Exactament al revés succeeix per als bacils humà i boví en què és alcalina la reacció de la varietat R i àcida la de S i Ch.

En l'assimilació dels glícids totes les variants de tots els tipus de bacil tuberculós es comporten en forma anàloga, car es verifica aquesta per la glicosa, maltosa, manita, levulosa, galactosa, fructuosa, ara-

binosa, trehalosa, glicerina i a vegades lactosa, en totes les quals es forma àcid.

La resistència bacteriostàtica als colorants i antisèptics, resulta més notable en les variants R que no en les Ch i S, mentre que aquestes resisteixen millor l'acció de la llum, calor i les condicions desfavorables de nutrició i envelliment.

La mobilitat, segons treballs recents de H. Plotz és més o menys constant en la variant S en què és independent de l'origen i l'edat del cultiu, mentre que no ho és en les variants R de diferents orígens, on la mobilitat varia també amb l'edat del cultiu i passa per un màxim cap a la tercera setmana. La intensitat de la mobilitat de la variant R és gairebé doble de la de la S corresponent a un mateix cep d'origen.

També es diferencien les variants R de les S pel que fa referència a l'aglutinació per les solucions àcido-topalls; segons experiments duts a terme seguint els mètodes de De Kruif i Reed i Rice les variants S del bacil humà i boví són aglutinades de pH. 2.4 a 3; les variants R ho fan a pH. 4.2-4.8; en el bacil aviar la varietat S ho fa a pH. 3.6-4, i la R a pH. 6.8-7.2.

L'àcido-resistència en el tipus S és un xic inferior a la del tipus R, i la densitat, o millor dit el pes dels gèrmens d'aquesta variant és de 4 a 5 vegades més gros que el de la variant anterior.

Els bacils de variant Ch són, generalment, avirulents per als animals de laboratori; els de la variant S del tipus aviar són fortament virulents per a la gallina i el conill mentre que els de la variant R, a menys de procedir per via intravenosa i en forma massiva, ho són molt poc. També en aquest darrer succeeix precisament el cas invers en els bacils tipus humà i boví, o sigui que per a aquests és la varietat R la que és fortament virulenta, mentre que els bacils de la S ho són relativament poc, tan poc, que poden arribar a la avirulència.

De tot el que acabem d'exposar es desprèn que l'estudi de la «variació natural», dita avui amb més elegància «dissociació», ha progressat notablement, i ha confirmat fets l'existència dels quals s'havia pogut observar fa molt de temps i que si es proscrivien abans, era perquè encara no es coneixia el fenomen en si mateix, sinó solament a través dels seus efectes. Recordarem només que en parlar de la variabilitat del bàcil tuberculós esmentàvem les grans discussions que va provocar la variació de pH observada en els medis de cultiu de gèrmens de tipus aviar i humà, i que aquest fet va fer creure en la inversió d'un tipus a l'altre i viceversa i les polèmiques que això va produir entre bacteriòlegs tan insignes com Schulz, Koch, Krause, Arloing,

Courmont, etc., per tal de defensar les seves teories «unicistes» o «dualistes». Avui sabem que aquests fets no eren cap disbarat, sota el punt de vista de l'observació, puix que trobem, efectivament, que el bacil aviar, que habitualment dóna una reacció alcalina al medi—car la variant dominant és la S—, aquest bacil té un altre estat, que és el R, una reacció àcida que precisament coincideix amb la que dóna habitualment el bacil tipus humà o boví que com sabem té per dominant la variant R.

Nocard féu un seguit d'observacions en les quals obligava els bacils dels mamífers a viure al fons del brou, i així obtenia una variabilitat de formes culturals que anaven des de les colònies llises i cremoses—que en aquell temps eren privatives del tipus aviar—, fins, a través d'unes altres d'un polimorfisme enorme, a les rugoses típiques, també llavors considerades com a privatives del bacil dels mamífers. Tenint en compte que aquestes experiències es duïen a terme en brou glicerinat i repassant aquelles dades generals que hem donat sobre les propietats de les variants R i S podem comprovar també que aquest fet no és erroni, puix que sabem que les variants Ch i S de tots els tipus de bacil tuberculós inicien el creixement en els medis glicerinats, precisament en forma difusa i que no és fins més tard que formen el vel. Aquesta variant és, segurament, la que Nocard havia obtingut en creure que havia reeixit a transformar el bacil tuberculós humà o boví en el tipus aviar quan l'obligava a desenvolupar-se en el si del medi en lloc de la forma superficial normal.

Però de la mateixa manera que veiem que els treballs moderns ens confirmen i ens expliquen experiències antigues, també ens esclareixen i rebaten unes altres, tals com la virulència del germen lligada al tipus de cultiu. Es desvirtuen especialment, a través dels treballs de Birkhaug, aquelles afirmacions, bon xic prematures, de Petroff i d'alguns altres investigadors, que feien creure invariablement en la virulència de totes les variants llises i que ens deien que, generalment, eren avirulentes o poc virulentes les rugoses de tots els tipus bacillars. Actualment resta demostrat que si bé la intensitat de la virulència en les dues variants d'un mateix tipus és gairebé oposada, aquest fet no està precisament rel·ligat a l'aspecte morfològic de la variant, sinó a un altre que gairebé podríem dir-ne genètic, i que és sempre altament virulenta o més virulenta la variant dominant que com sabem és la llisa o S. per al tipus aviar i la rugosa R per al boví i humà.

CULTIU DEL BACIL TUBERCULOS

D'ençà que Koch va descobrir l'agent causant de la tuberculosi, ell mateix primer i després nombrosos investigadors, van assajar de cultivar-lo. R. Koch, en fracassar en els seus primers intents de cultiu portats a terme amb agar i brou ordinari, afirmà «que no era d'esperar que el cultiu del bacil de la tuberculosi pogués ajudar positivament en l'estudi d'aquesta malura», però més tard ell mateix rectificà, puix que fou el primer a obtenir colònies macroscòpiques, sembrant tubercle triturat sobre un medi compost de sèrum de moltó i de bou, coagulat.

Al treball de Koch van seguir els de Nocard i Roux, que introdueixen la glicerina en la composició dels medis de conreu per al bacil tuberculós. Aquesta és, segurament, l'adquisició més important que s'ha fet en aquest sentit, puix que la glicerina afegida en una proporció del 5 al 8 per 100 en aquells mateixos medis on va fracassar Koch (brou i agar ordinari) els fa aptes al cultiu del bacil de Koch.

Segueix després la patata glicerinada, que es deu a Pawlowky, la qual ha rendit tan bons serveis que encara avui s'utilitza moltíssim en tots els laboratoris. La utilització de sang en els medis de cultiu va ésser iniciada per Bezançon i Philibert, però amb poca acceptació, ja que difícilment podia substituir la patata glicerinada.

Un dels medis molt utilitzat actualment i especialment pel que fa referència a la recerca del bacil de Koch en els productes patològics, és el medi a base de l'ou. Aquest va ésser recomanat per primera vegada per Capaldi (1896), però el primer que el va utilitzar va ésser Dorset (1902) i fou perfeccionat més tard per Lubenau en afegir a aquest, suc de carn macerada glicerinat al 5 per 100.

Van venir després els medis líquids sintètics, Kuhne, Proskauer i Beck, Sauton, Dorset, Long, Seibert, etc., tots ells utilitzats per a l'obtenció de tuberculines.

Per últim, en aquests darrers temps i principalment estimulats per la recerca del bacil tuberculós a la sang i als humors, diversos investigadors han perfeccionat notablement els medis a base d'ou; primer és Petroff, més tard Hohn, els quals a més hi afegeixen una substància colorant, el violeta de genciana, per tal d'evitar el creixement d'altres gèrmens, la qual substància és canviada pel cristall violeta per Corper i Uyei.

Més tard Petraghiani, fa un medi mixt de llet, ou i peptona i subs-

titueix els violetes pel verd de malaquita, un cop ha trobat que aquest serveix molt bé per a aturar el creixement de bolets i altres elements que no interessen.

I per últim, després d'aquest que ja reunia uns grans avantatges sobre els esmentats anteriorment, ve el medi Löwenstein, darrerament modificat per ell mateix, el qual avui podem assegurar que és el medi més universalment emprat en la investigació del bacil de Koch als productes patològics.

Principals medis de cultiu

Medis líquids.

Sauton :

Asparagina	4	grs.
Glicerina... ..	60	»
Acid cítric	2	»
Fosfat bipotàssic... ..	0.5	»
Sulfat de magnèsia	0.5	»
Citrat de ferro amoniacal	0.05	»

Portar a pH 7.2 amb amoníac pur i esterilitzar.

Medis mixtos:

Patata glicerinada:

Es tallen amb un foradataps uns cilindres de patata, que després es parteixen en dos trossos, seguint un pla transversal a l'alçada, de tal manera que els trossos un cop pelats vinguin a tenir uns 5 a 6 cms. de llarg i 15 mm. de diàmetre a la base (això si s'empren tubs de 16 o 18 mm. de diàmetre interior). Aquests trossos se submergeixen immediatament en una solució de bicarbonat de sosa al 10 per 100, on es deixen una o dues hores a fi de neutralitzar l'acidesa de la patata; després s'eixuguen amb un drap i es posen un a cada tub d'assaig de Roux, omplert prèviament fins a l'estrangulació amb brou glicerinat al 5 per 100. Es tapen els tubs amb cotó i s'esterilitza a l'autoclau a 120° durant 30 minuts. Un cop estèrils els tubs es caputxonen amb caputxons de goma prèviament esterilitzats.

Patata biliada de Calmette i Guérin:

El fel recollit estèrilment a l'escorxador es filtra per mitjà de drap i paper i, posat en matrassos s'esterilitza a 120° durant mitja hora. Fet

això es deixa en repòs. Es convenient no utilitzar el fel fins passat un parell de mesos i prèvia filtració per paper.

Les patates es tallen com per a la patata glicerinada, es renten amb aigua de l'aixeta, i es posen 3 hores a bany maria a 70° en el fel glicerinat al 5 per 100. Després es reparteixen en els tubs de Roux, omplint fins a l'estrangulació del tub amb el mateix fel en què han estat submergits. S'esterilitza durant 30 minuts a 120°.

Medi a base d'ou:

Medi de Petragani:

En un flascó d'un litre es posen:

150 c. c. de llet de vaca, neutralitzada.

6 grs. de fècula de patata.

1 gr. de peptona.

Una patata d'una mida com un ou de gallina, tallada a trossos.

Es submergeix el matràs en aigua bullent en què es manté fins que el tot sigui ben homogeni i s'hagi tornat espès (generalment uns 8 a 10 minuts). Durant tot aquest temps s'haurà assegurat l'homogeneïtat continuada del medi si s'ha donat un moviment de rotació al matràs i aquest moviment se suspendrà un cop assolit el grau d'espessiment que esmentàvem ara mateix, però llavors encara deixarem el tot submergit en l'aigua bullent durant una hora. Després es treu i es deixa refredar fins a 56°, i s'hi afegeix en aquest moment 4 clares i 5 rovells d'ou, 12 c. c. de glicerina, i 10 c. c. de verd de malaquita al 2 per 100. S'agita bé, i es filtra a través de gassa estèril en un matràs també estèril. Un cop filtrat es reparteix en tubs prèviament esterilitzats. Es coagula en posició inclinada, per escalfament a 85° durant 30 minuts; l'endemà es repeteix aquella, però solament a 75° durant mitja hora més.

Medi de Petragani a l'asparagina (Saenz)

En un Erlenmeyer de un litre es posen:

100 grs. de boles de vidre estèrils.

250 grs. de llet fresca de vaca.

16 grs. de fècula de patata.

1.5 grs. d'asparagina.

Es fa bullir al bany maria, agitant freqüentment, durant una hora, o sia fins que el tot prengui una consistència de puré espès; es refreda fins a 60° i s'afegeixen 8 clares i 10 rovells d'ou; s'agita i quan l'e-

mulsió és ben homogènia es filtra a través de gassa estèril i s'hi afegeix:

24 grs. de glicerina estèril.

15 c. c. de solució aquosa de verd de malaquita al 20 per 100.

Es distribueix, estèrilment, prèvia homogeneïtzació en tubs de 19 mm., a raó de 8 c. c. per tub. Es coagula en posició inclinada durant mitja hora a 85°. Es treuen i es reemplaça el tap de cotó per taps massissos de goma prèviament esterilitzats, i s'evita d'aquesta manera la dessecació del medi.

(Creiem més útil i de menys perill d'infecció per al medi de substituir aquesta tècnica per l'aplicació de caputxons de goma, o bé aplicar el tap de goma sobre del cotó.)

Medi de Löwenstein

Es preparen asèpticament les solucions següents:

- | | | | |
|---|---|--|--------|
| A | { | Asparagina | 3 gr. |
| | | Fosfat monopotàssic | 1 » |
| | | Citrat de Sosa | 1 » |
| | | Sulfat de Magnèsia | 1 » |
| | | Glicerina bidestillada | 60 » |
| | | Aigua destil·lada | 1000 » |
| | | S'esterilitza dues hores a vapor fluent. | |
| B | { | Se submergeixen tomàquets de bona qualitat en alcohol de 96° i s'hi deixen dues hores. | |
| | | Es pelen, i posats dins d'un drap fi i estèril s'espremen i es recull el suc en un matràs també estèril. | |
| C | { | Fècula de patata (Merck) | 10 gr. |
| | | Glicerina bidestillada | 20 » |
| | | S'esterilitza 15 minuts a 100° i una hora a 56°. | |
| D | { | Verd de Malaquita | 2 gr. |
| | | Aigua destil·lada | 100 » |
| | | S'esterilitza dues hores a vapor fluent. | |

En un matràs estèril amb boles de vidre també estèrils, es posa:

600 c.c. de solució A

60 c.c. » » B

10 c.c. » » C

Es manté a bany maria a 56° durant dues hores, agitant continuament.

Passat aquest temps s'hi afegeix:

$$\left. \begin{array}{l} 16 \text{ clares d'ou} \\ 20 \text{ rovells d'ou} \end{array} \right\} (16 \text{ ous} + 4 \text{ rovells}).$$

(Aquests ous hauran estat prèviament rentats i mantinguts durant 3 hores en alcohol de 96°.)

S'agita ben agitat i s'afegeixen 20 c. c. de solució D.

Es filtra per gassa estèril i es reparteix en tubs prèviament esterilitzats a raó de 5 a 6 cm³ per tub.

Es tindallitzen, inclinats, el primer dues hores a 80° i el següent una hora a 75°

Es caputxonen amb caputxó de goma i es controla l'esterilitat deixant-los 24 hores a l'estufa.

Sensibilitat dels medis de cultiu

Han estat realitzades nombroses experiències a fi d'establir la sensibilitat dels diferents medis de cultiu. Deixem a part els medis líquids, orgànics i sintètics dels quals sabem que l'elegit acostuma a ésser sempre el de Sauton, tant per la simplicitat de preparació com pels resultats. Tots ells serveixen principalment per a l'obtenció de tuberculina, masses de gèrmens, estudis de fermentacions de sucres, i preparació de la vacuna B.C.G. Ens ocuparem breument de les recents aportacions sobre la sensibilitat dels medis sòlids més utilitzats en la recerca del bacil de Koch als productes patològics.

Refonent les experiències de Von Huth i Lieberthal, trobarem que els medis a base d'ou són molt més sensibles que la patata glicerina, com ho proven els resultats de les experiències dutes a terme sobre uns 300 tubs:

	Medi a base d'ou	Patata glicerina
Tubs positius	190	132
» negatius	93	141
» infectats	17	27
Període protogerminatiu mitjà.	13 a 16	29 a 35 dies

o sigui que resulta d'un avantatge notabilíssim la utilització de medis a base d'ou. Però d'aquests medis reconeguts com a bons n'hi ha una pila; Dorset, Petroff, Lubenau, Petragnani, Petragnani modificat per Saenz, Hohn, Löwenstein.

El que cal, doncs, és precisar una mica els fets i veure entre aquells quin és el més sensible. La comprovació d'aquesta naturalesa més recent amb què comptem és la realitzada per Costil, sota la guia de Saenz. Les seves experiències han estat portades a terme amb els medis de Lubenau, Petroff, Hohn, Petragnani, Löwenstein-Roig Congo, Löwenstein-Verd de malaquita i Petragnani modificat per A. Saenz; i els bacils utilitzats han estat el *B. humà* Ratti i el *boví* Vallée, provinents de cultiu en patata glicerinada.

El resultat mitjà de diverses experiències és el següent:

Nombre de Colònies al cap de 30 dies:

Mgrs. de bacil sembrats	Lubenau	Petroff	Hohn	Ptra.	L. R.	L. V.
<i>Ratti</i>						
0.000.1	14	8	10	14	∞	∞
0.000.01	4	0	1	2	∞	∞
0.000.001	0	0	0	0	0	0
<i>Vallée</i>						
0.000.1	11	1	22	28	∞	∞
0.000.01	0	0	0	3	2	∞
0.000.001	0	0	0	0	0	1

Colònies aparegudes als 17 dies:

	Petragnani original	Petragnani-Saenz
<i>Ratti</i>		
0.000.1	33	44
0.000.01	18	21
0.000.001	4	17
0.000.0001	0	0

Colònies aparegudes als 17 dies:

	Petr. orig.	Petr. Saenz	Löwenstein
<i>Vallée</i>			
0.000.1	54	72	67
0.000.01	7	9	10
0.000.001	2	2	2
0.000.0001	0	0	0

De tot això resulta que els medis més sensibles, d'entre els que estan al nostre abast avui dia per a la recerca del bacil de Koch, són el Petragani i el Löwenstein. Aquest darrer és el que utilitzem fa força temps i amb resultats molt bons, i encara l'hem millorat amb la tècnica de sembra de Domingo, que explicarem en parlar de la recerca del bacil als productes patològics.

RECERCA DEL BACIL DE KOCH ALS PRODUCTES PATOLOGICS

Aquesta investigació pot ésser directa i mediata.

La investigació directa és la que es fa per l'observació al microscopi de frotís tenyits segons les tècniques de coloració corrents.

Quan es tracta de sediments, culots de centrifugació, frotís d'esputs, òrgans, exsudats, transsudats, etc., la tinció d'elecció és la de Ziehl-Neelsen; moltes d'altres han estat recomanades, però aquesta és la que sempre ens ha donat més bons serveis. Sols una advertència creiem útil de fer i és que tots els humors cal fixar-los, després d'haver secat l'extensió a temperatura no superior a 40-50° i encara millor a la temperatura del laboratori; la millor tècnica de fixació és la de deixar l'extensió submergida, o millor recoberta d'alcohol i tenir-la així 1 o 2 minuts.

La recerca de bacils en els òrgans, es portarà a terme sobre talls preparats segons les tècniques corrents i tenyits segons les tècniques de Domingo-Grau, Ziehl o la d'Hollande.

Tot seguit descriurem les tres, encara que per la seva senzillesa i els extraordinaris resultats hem utilitzat sempre la primera o sia la tècnica de Domingo-Grau.

Tècnica Domingo-Grau

Fixació, amb formol al 10 %.

24 hores a 5 dies, segons el volum de la peça.

Deshidratació, per passades successives per alcohol de 70°-90° i absolut.

24 hores en cada un, tenint cura d'agitar de tant en tant.

Deixar 24 hores en una barreja d'alcohol-èter a parts iguals.

Inclusió. Deixar 3 dies en una solució de celoidina molt fluida i després 3 dies més en celoidina molt concentrada.

Muntatge, sobre bloc de fusta. Deixar que es formi una pel·lícula superficial de dissecció i introduir en un flascó amb alcohol de 70°, on es deixa 24 hores.

Fer talls. Muntar sobre portaobjectes absolutament nets, i que tinguin a la superfície una petita quantitat d'albúmina de Mayer, procurant que l'adhesió sigui com més perfecta millor.

Rentar amb alcohol absolut.

Rentar amb aigua.

Tenyr.—Introduint el porta en una càpsula on hi ha fucsina de Ziehl a 60° i deixar-l'hi durant una hora.

Rentar amb aigua

Deixar un minut en acetona.

Tractar durant tres minuts amb una solució de picrocarmí, preparada segons la fórmula:

Solució saturada de picrocarmí ...	50	c.c.
Carmí d'anyil... ..	0.5	»
Alcohol de 96°	50	»

Rentar amb aigua.

Rentar amb alcohol absolut, durant tres minuts.

Aclarir amb essència de Cayeput.

Muntar al Bàlsam.

Tècnica de Ziehl:

Fixades les peces amb alcohol o formol, els talls es tracten de 2 a 5 minuts amb hematoxilina a fi de tenyir els nuclis de les cèl·lules. Es mantenen submergides durant dues hores en fucsina de Ziehl a 37°, o 24 hores a la temperatura del laboratori. Es decoloren amb clorhidrat d'anilina i després amb alcohol de 96°; es renten amb aigua i es fa la coloració de fons amb solució alcohòlica saturada d'àcid pícric.

Tècnica d'Hollande

Es fixen les peces, en el Bouin-Hollande (àcid tricloracètic 12 gotes per 100) durant un temps de 4 a 7 dies, segons la magnitud de la peça; es renten amb aigua formolada al 3 per 100 durant 48 hores; s'inclouen en celoidina i es fan talls de 4 a 5. Un cop el tall és al porta, es recobreix de fucsina de Ziehl recent filtrada, i s'escalfa 3 vegades en 5 minuts, fins a emissió de vapors, tenint cura que la preparació no resti mai seca; es renta amb aigua, i es decolora amb àcid

nítric al 1/3; es renta abundantament amb aigua i es tracta amb alcohol de 60° fins que no presenti més que una lleugera i uniforme coloració rosa.

Els talls es tracten després, ja sigui amb hematoxilina, amb clorocarmí o de preferència amb l'*hemalum* (coloració 15 minuts i rentat en aigua corrent durant 3 hores).

Un cop feta la coloració nuclear se submergeixen les preparacions en una solució de Taronja G. a 0.50 per 100 durant una hora; es renta amb aigua destil·lada i es fixa el taronja deixant el tall 30 segons en una solució aquosa d'àcid fosfomolibdíc al 5 per 100; es torna a rentar amb aigua destil·lada; se submergeix 10 segons en una solució aquosa de verd lumière al 0.12 per 100, es renta amb alcohol de 95°, i es deshidrata per dues passades en alcohol isoamílic (10 minuts), es passa per una barreja d'alcohol isoamílic i xilol i per xilol pur i es munta al Bàlsam.

Els bacils resten tenyits en vermell, els nuclis i les cèl·lules en blau, les collàgenes en verd intens i els hematies en vermell.

En la recerca directa, les preparacions hauran de sofrir un examen minuciós i per un temps mínim de 30 minuts; sense complir aquest requisit els resultats negatius obtinguts en aquesta prova perden tot llur valor.

Investigació mediata

Aquesta es fa per dos sistemes, pel del cultiu i pel de la inoculació experimental al cobai.

L'un i l'altre necessiten sempre una preparació prèvia del material de què es disposa, i per bé que les tècniques són molt variades, totes tendeixen a dos objectius: el primer i principal és el de recollir el màxim nombre de gèrmens en aquell volúm reduït que se sembra o inocular, ja que salta a la vista que aquests mètodes sols s'utilitzen en aquells casos on la investigació directa portada a cap almenys durant mitja hora, no hagi donat resultat; i el segon el de destruir tota la flora microbiana i els micets, que, en desenvolupar-se en els medis selectius, entorpiria o desvirtuaria el diagnòstic.

Abans de parlar d'aquestes tècniques aplicades als diferents productes patològics, recordarem que en parlar dels medis de cultiu hem consignat la màxima sensibilitat dels preparats segons Petraghani-

Saenz i Löwenstein; aquest darrer és el que al nostre entendre hauria d'emprar-se preferentment per ésser el que a nosaltres sempre ens ha respost degudament. Però si important és el medi, creiem que encara ho és més la tècnica de sembra, ja que les emprades fins avui, donen lloc a fàcils errors d'interpretació i de recerca, especialment a l'investigador poc fet a diagnosticar bacils de Koch; el rasclat dels tubs té dos greus inconvenients; el primer és que en rasclar la superfície hom s'emporta una certa quantitat de medi o d'impureses que si no equivoquen el diagnòstic de l'home experimentat, sí que l'entorpeixen granment, i en segon lloc, que en esbarriar la matèria sembrada a tota la superfície del tub, es corre el perill que en fer el rasclat es deixi sense efectuar-lo precisament al punt allà on s'allotja una microcolònia, fet aquest que és molt possible, ja que no seria la primera vegada d'haver-nos crescut una colònia en el límit precís del medi amb el tub de vidre. Per tal d'obviar aquests perills, ara fa bastant temps que utilitzem la tècnica de Domingo perquè és molt senzilla, i racional, i els seus resultats responen perfectament. Aquesta tècnica consisteix únicament a posar a la superfície del medi de Löwenstein (un cop aquest estigui fet i a punt d'usar) unes tires de paper de fumar, prèviament esterilitzat. Com que tot s'ha de fer asèpticament, cal posar el paper mitjançant unes pinces llargues esterilitzades.

Al moment d'utilitzar aquests tubs es procedeix en tot com de costum, menys en la distribució del material a sembrar que es disposa i s'escampa precisament damunt la tira de paper. Això té com a avantatge que el dia que cal fer el reconeixement del tub en lloc de rasclar tota la superfície del medi, és suficient retirar el paper i d'aquesta manera es té la seguretat que s'han recollit totes les colònies possibles si és que n'han crescut. Un cop tret el paper s'aplica contra un portaobjectes la cara en la qual es va efectuar la sembra i on es presumeix que hi ha el cultiu i es fa pressió a tot el llarg de l'altra, a fi que tots els gèrmens restin adherits al portaobjectes, i havent acabat s'escalfa per tal de fixar-los, i fet això es treu la tira de paper i es tenyeix com de costum.

Quant a la inoculació experimental, encara que hagin estat recomanades diverses tècniques, nosaltres hem emprat sempre la via subcutània i la intraganglionar.

La subcutània la realitzem a la cuixa, en la forma acostumada.

La intraganglionar, la fem seguint la tècnica de Ninni, que ve a ésser la següent:

Es depila tota la regió submaxilar i del coll; s'incideix la pell

sobre la línia mitjana del coll, i es desprenen, mitjançant la sonda, els ganglis cervicals inferiors del paquet vàsculo-nerviós que volta aquells. Aquests ganglis tenen la mida d'una lletia i estan situats a cada costat de la tràquea. Per inocular es fixen amb una pinça prima de punta roma, sostinguda amb la mà esquerra, i amb la mà dreta es procedeix a inocular 0.1 o 0.2 c. c. de líquid, tenint cura que l'agulla es trobi més o menys enfonsada fins al mig del gangli i curant de no fer esclatar la càpsula ganglionar.

La ferida es tanca amb graps Michel. La cosa important d'aquesta intervenció és que sigui realitzada en condicions d'absoluta esterilitat, puix que molt sovint els cobais moren d'infeccions secundàries i principalment de septicèmia.

La lectura dels resultats es farà als medis de cultiu, cada tres dies, a partir dels set dies, rasclant la superfície dels tubs; o bé, si s'ha seguit la tècnica de Domingo, cisant el paper d'una part dels tubs sembrats, i amb aquest material es fa una tinció de Ziehl i s'observa al microscopi almenys durant mitja hora.

En la inoculació al cobai es vigilarà, quan la inoculació s'ha fet per via subcutània, l'aparició de l'infart dels ganglis inguinals, que una vegada sigui efectiva, podran traure's i fer-ne frotís per tal de controlar si la causa de l'infart és el bacil tuberculós; en cas que aquesta reacció sigui negativa, als 25 o 30 dies se sacrificarà i dissecarà l'animal i es buscaran les lesions tuberculosos.

Si la inoculació ha estat feta segons tècnica de Ninni, la lectura es farà, entre els 9 i 14 dies després de la inoculació, estreient el gangli injectat i el seu veí, dels quals farem frotís; en cas d'ésser positiu el nombre de bacils és sempre elevat.

Els cobais a inocular hauran d'ésser negatius a la reacció a la tuberculina. A partir del moment en què s'ha inoculat i durant el període que dèiem abans es va practicant aquesta reacció, els resultats de la qual són molt útils per al diagnòstic final.

TECNQUES DE PREPARACIO DEL MATERIAL A SEMBRAR O A INOCULAR

Esputs

Mètode a l'antiformina.—Preconitzat per Uhlenhut i Kersten i emprat llargament per Weber, Dieterlein, Liedman i Stanley Griffith.

L'antiformina es prepara barrejant parts iguals d'aigua de Javel i sosa càustica al 15 per 100.

Volums iguals d'esput i antiformina són posats en contacte i agitats vigorosament durant 5 o 10 minuts, es centrifuga i el sediment se sembla en una sèrie de tubs de medi a base d'ou.

Mètode del NaOH.—Petroff empra, en lloc de l'antiformina, una solució de NaOH al 4 per 100. Posa volums iguals d'esputs i NaOH, ho agita vigorosament, ho deixa a l'estufa a 37° durant mitja hora; torna a agitar i altra vegada ho deixa a l'estufa per un temps igual a la primera.

Es centrifuga, es recull el sèdiment, es neutralitza amb ClH al 4 per 100, posant com a indicador tornassol, i se sembla com sempre en tubs de medi a base d'ou.

Petragnani, procedeix en forma anàloga, però no centrifuga.

Mètode al SO₄H₂.—Hohn, tracta l'esput per 10 c. c. de solució d'àcid sulfúric al 10-12 per 100, deixa en contacte uns 20 minuts agitant freqüentment i vigorosament, centrifuga 5 minuts a gran velocitat i sembla el sediment en medi a base d'ou.

Löwenstein, modifica aquesta tècnica, en el sentit que en comptes d'utilitzar una quantitat qualsevulga d'esput, en pren 2 c. c. i els posa en contacte amb 8 c. c. de solució d'àcid sulfúric al 15 per 100, deixa en contacte 10 minuts, sense deixar d'agitar; centrifuga a gran velocitat, renta el sediment amb solució salina, torna a centrifugar i sembla com de costum.

Nosaltres emprem, generalment, aquest darrer procediment, amb la diferència que neutralitzem el sediment abans de la darrera centrifugació, i així obtenim millors resultats.

Hi ha encara altres procediments, entre els quals esmentarem el de Saenz i Costil. Aquests autors, renten l'esput amb solució salina i l'homogeneïtzen triturant-lo en un morter estèril amb sorra fina de quars, també estèril, i un cop obtingut un producte d'aspecte uniforme el tracten per àcid sulfúric al 15 per 100, deixant en contacte mitja hora i agitant de tant en tant; després neutralitzen amb NaOH al 30 per 100, utilitzant com a indicador unes gotes de tintura de tornassol, fins aproximadament a pH 7.2 (color lila). D'aquest líquid en sembren una porció en una sèrie de tubs de medi a base d'ou, una altra s'inocula al cobai, i per últim se'n fa una preparació de Ziehl per ratificar o rectificar l'examen directe.

En aquests darrers temps, els mètodes a l'àcid sulfúric s'han imposat, i han restat descartats els de liquació espontània de L. Rabino-witch, que va ésser el primer utilitzat per a l'enriquiment de l'esput, la liquidació a l'autoclau que més tard va substituir el primer i molts

d'altres dels quals seria molt llarg de fer esment. Els mètodes a la sosa tot i que s'utilitzen molt poc, encara poden rendir bons serveis en casos d'esputs molt compactes.

Exsudats pleurals

Es cisen 15 a 20 c. c. d'exsudats i s'evita la coagulació mitjançant l'afegiment de 2 c. c. de solució estèril de citrat de sosa al 10 per 100. Es centrifuga un quart d'hora a una mínim de 3000 rev.; es decanta deixant amb el culot de sedimentació aproximadament 1 c. c. del líquid en què s'emulsiona. Se'n fan dues parts: la primera es dilueix en 2 c. c. de solució salina estèril i s'inocula a dos cobais per via subcutània; la segona es dissocia en un morter estèril amb sorra estèril de quars, s'hi afegeix 1 c. c. d'àcid sulfúric al 15 per 100 i es deixa en contacte durant mitja hora; s'afegeix tintura de tornassol i es neutralitza amb sosa al 30 per 100, fins a obtenir una tinta lleugerament rogenca o sia deixant-la lleugerament àcida; se sembla almenys en 8 tubs de medi a base d'ou.

Aquesta tècnica ha permès a Saenz i Costil, trobar bacils tuberculosos en un 60 per 100 dels casos on la recerca directa donava resultat negatiu. I en parlar de recerca directa ens cal fer constar que en els exsudats s'ha d'anar molt amb compte, perquè la presència de fibrina fa aquesta recerca molt delicada, ja que els filaments d'aquesta es tenyeixen fortament per la fucsina àcida, la qual cosa pot donar fàcilment lloc a errors. Aquesta investigació directa en els exsudats es fa sempre sobre extensions fetes amb el sediment resultant de la centrifugació d'almenys 5 c. c. d'exsudat.

Líquid cèfalo-raquidi

Quan la tinció d'un frotís no ens reveli la presència de bacil tuberculós, ni de gèrmens d'associació, se sembrarà directament i encara millor amb el sediment resultant de la centrifugació de 10 o 20 c. c. a gran velocitat, en medi a base d'ou recentment preparat.

En cas d'haver-hi gèrmens d'associació es procedirà com segueix:

10 c. c. de L. C. R. són centrifugats durant 20 minuts a un mínim de 3000 rev.; es decanta el líquid que sobreneda deixant-ne cosa de 1 c. c.; en aquest c. c. es disgregarà el sediment i es tracta per una solució d'àcid sulfúric al 15 per 100, s'agita fortament i es deixa en contacte de 5 a 10 minuts, passats els quals es posa tornassol com a

indicador i es neutralitza amb sosa al 30 per 100. Del líquid final se'n separa una part per tal de fer inoculació al cobai, i la resta es reparteix en una sèrie de tubs de medi Löwenstein recentment preparat.

Hi ha encara el mètode de Despeignes, anterior a aquest, molt més senzill, però de resultats no tan elevats. Consisteix únicament a agitar fortament el líquid cefalo-raquidi i sembrar-lo abundantament en una llarga sèrie de tubs.

Contingut gàstric

L'examen del contingut gàstric, especialment en els infants, pren cada dia més importància, puix que sembla resultar dels treballs de Sayé, Shelton i Alsina, que el resultat pot arribar a ésser positiu abans i tot de l'aparició dels fenòmens al·lèrgics, fet que ha estat confirmat per comunicacions d'altres investigadors com Ligner, Zeyland i Pia-secka.

El líquid obtingut per rentat gàstric en dejú, es centrifuga a gran velocitat durant mitja hora, es recull el sediment i s'homogeneïtza per una de les tècniques corrents, i el líquid resultant, una meitat s'inocula per via subcutània al cobai, i de l'altra se'n fa una preparació per examen directe, i tot el remanent es distribueix en 6 o 8 tubs de medi a raó de 1/2 c. c. per tub.

Orina

Els treballs continuats sobre la possibilitat d'evidenciar la tuberculosi renal, i per tant la recerca del bacil de Koch a l'orina, ha fet que nombrosos investigadors com Hohn, Fischer, Urgoiti, Breckman, van Riemsdijk, Norton, Thomas, von Hut, Liebertal i ara últimament Dimtza, Despeignes, Saenz i Costil anessin polint les tècniques. Descriurem les principals:

Tècnica de Despeignes.—100 c. c. d'orina cisada asèpticament per sondatge es centrifuguen a alta velocitat, el sediment obtingut es tracta amb NaOH al 4 per 100, es manté el tot a 37° durant una hora, bo i agitant de tant en tant; al cap d'aquest temps es centrifuga 15 minuts, s'acidifica el sediment amb ClH al 4 per 100 i se sembra en medi a base d'ou.

Tècnica de Costil i Saenz.—300 c. c. d'orina si és clara, i 50 c. c. si és tèrbola o sanguinoleta, es centrifuga a gran velocitat, el sediment obtingut s'homogeneïtza en un morter estèril amb sorra també estèril; es tracta amb àcid sulfúric al 15 per 100 durant 20 o 30 minuts; es

neutralitza amb NaOH al 30 per 100 i se sembren un mínim de 8 tubs a raó de 0.5 c. c. per tub, i la resta s'inocula al cobai.

Matèries fecals

La presència de bacil tuberculós a les matèries fecals, pot ésser deguda a moltes causes, tals com la tuberculosi ulcerativa del budell, la ingestió d'aliments procedents d'animals tuberculosos, com també es troben en aquells tuberculosos pulmonars queingereixen els seus esputs.

Tècnica de Fabrici.—Un fragment de material del gruix d'un cigró es dissocia en 15 c. c. d'aigua destil·lada, es centrifuga lleugerament durant dos o tres minuts i es decanta; aquest líquid decantat es barreja a parts iguals amb una solució al 20 per 100 d'antiformina; després de 20 minuts s'afegeix un volum igual d'alcohol absolut, s'agita vigorosament i es centrifuga a gran velocitat.

A partir del sediment obtingut es fan frotís, que es fixen pel calor, es tracten dos minuts amb àcid acètic glacial, es renta, se seca i després de fixar novament a la flama es tenyeix per la tècnica de Ziehl.

Aquest sediment també pot servir, prèviament diluït, per a inocular al cobai.

Tècnica de Moreau.—Triturar en un got o en un morter, 50 grs. de matèries fecals i afegir a poc a poc una solució de clorur sòdic al 25 per 100 fins a obtenir una massa semilíquida. Filtrar per gassa i repartir en tubs de centrifuga, afegint a cada tub 2 c. c. d'una barreja a parts iguals de ligroïna i èter de petroli. Centrifugar 10 minuts a 4-5000 revolucions. Es forma una capa de separació dels dos líquids i és allà on cal recollir el material necessari per a fer el frotís i les inoculacions. En aquest darrer cas el material haurà d'ésser diluït en solució salina abans d'inocular.

Tècnica de T. Ogawa.—Es la més senzilla i acostuma donar molt bons resultats. El material cal recollir-lo en recipients estèrils i tractar-lo i utilitzar-lo el mateix dia. Es millor que les deposicions no siguin massa dures, i per tal de facilitar això, si és necessari, s'administrarà al malalt un laxant a la vetlla.

1 c. c. de matèries es posa en un morter estèril i s'emulsiona en 12 a 15 c. c. de solució de tripaflavina al 1 per 1000. Una bona tècnica és malaxar primer les femtes soles i havent acabat incorporar-hi a poc a poc la solució de tripaflavina; un cop obtinguda una emulsió homogènia es filtra sobre gassa estèril (6 gruixos), i si tot ha estat ben fet

s'obtindrà un líquid uniformement tèrbol. A aquest, un cop filtrat, s'hi addiciona un volum doble d'àcid sulfúric al 1 per 100. Es deixa en contacte una hora, després es centrifuga a forta velocitat, 4 ó 5000 rev. durant uns 10 minuts, tenint cura que el tub estigui tapat amb un caputxó metàl·lic. El sediment resta fortament adherit al fons del tub, la qual cosa permet una decantació que podríem dir perfecta; després es deixa el tub capgirat damunt gassa estèril per tal de completar la decantació durant uns 5 minuts. El sediment se sembla en medi Löwenstein mitjançant una espàtula metàl·lica que permet una distribució uniforme per tota la superfície del medi; el nombre de tubs ha d'ésser almenys de 8. Seguint aquesta tècnica, aquest darrer temps, diversos autors, entre els quals hi ha Carnot, Laverigne i Filhker, han obtingut molt bons resultats.

Aquest sediment pot també inocular-se al cobai, el qual suporta molt bé la injecció encara que habitualment la septicitat dels excrements sol ésser molt gran; a més sovint sembla que no presenta ni tan sols reacció local.

Sang

El mètode emprat per a la recerca del bacil tuberculós a la sang és generalment el preconitzat per Löwenstein. Diversos autors han introduït modificacions per tal de perfeccionar aquella tècnica, però podem dir que no augmentaven gaire les probabilitats de trobar bacils, i això per un fet molt senzill que ens ha resolt Domingo utilitzant el mètode recentment presentat a la Societat de Biologia de Barcelona. El bacil tuberculós ve a tenir aproximadament la mateixa densitat de la sang i això feia que encara que la centrifugació es realitzés a grans velocitats la sedimentació total era molt difícil, i com que els gèrmens restaven gairebé sempre, a més o menys profunditat, però en el líquid que sobrenedava, en quantitat no despreciable, resultava que cada vegada que es decantava per tal de rentar el sediment, s'incorria en el perill de llançar la major part de bacils existents a la sang que es tractava. La tècnica de Domingo és molt senzilla i fàcil d'aplicar: la sang citratada es posa als tubs de centrifuga i es tracta per 3 vegades el seu volum de la barreja següent:

Aigua destil·lada	100 c. c.
Alcohol de 95°	25 c. c.
Sosa normal	1 c. c.

Aquesta solució es prepara dissolent la sosa en aigua, esterilitzant a 115° durant 30 minuts, afegint llavors l'alcohol, que, per tal de tenir-lo estèril, s'haurà d'haver destil·lat en recipients estèrils.

La sang així tractada s'hemolitza ràpidament, i deixa per centrifugació un sediment molt reduït, en el qual és sovint possible de trobar bacils a l'examen directe. Per sembrar o inocular el sediment caldrà rentar-lo dues vegades més amb el mateix líquid, tenint cura de disgregar bé el sediment cada vegada que es centrifuga, la qual cosa es pot fer bé amb un capillar que disgregarà primer el sediment sol, i després d'aquesta operació, bo i agitant s'hi afegirà el líquid.

Després de la darrera centrifugació es disgregarà i se sembrarà el sediment seguint la tècnica de Domingo.

Llet

Els mètodes utilitzats correntment per a l'isolament del bacil tuberculós del material patològic en general, no han donat bons resultats en l'isolament del bacil de Koch a la llet. Maddock, en un estudi molt acurat i complet d'aquesta qüestió, ha trobat que la purificació del material portada a terme amb SO_4H_2 al 6 % com també utilitzant NaOH al 4 % no dona bons resultats, perquè s'infecten gran nombre de tubs i si per obviar aquest inconvenient procedeix amb concentracions de SO_4H_2 més altes, abans d'arribar al 15 % que és l'òptima i cap al 12 %, ja es troba que el creixement de bacil és seriosament dificultat.

Aquest mateix autor proposa un altre procediment que dona bons resultats. En aquests utilitza, com a substància substitutiva del SO_4H_2 i de la NaOH, una solució de ClOH + NaOH que prepara tirant una solució ClOH damunt una altra de NaOH al 15 % en la quantitat necessària perquè la riquesa final en clor sigui de 327.3 parts per milió.

La tècnica de preparació de la llet abans de sembrar és la següent:

Es centrifugen 15 c. c. de llet, se separa el sèrum i el sediment es tracta per un volum igual de NaOH + ClOH i es deixa tres hores a 37° .

Es centrifuga de nou, es renta el sediment i se sembla en medi de cultiu a base d'ou.

Quan la llet no té gèrmens d'associació, cosa que es pot veure en una extensió del culot de centrifugació tenyida amb blau de metilè, pot procedir-se com segueix:

75 c.c. de llet són centrifugats durant 20 minuts a 4.000 rev. p. m.

Se separa el sèrum i el sediment es tracta amb un volum igual de NaOH al 4 % o de SO_4H_2 al 6 % i es deixa a 37° durant una hora. Es centrifuga, es renta i se sembra en medi a base d'ou. També es pot inocular al cobai.

Mantega de vaca

Tècnica de Savage.—Es posa la mantega en un tub de centrífuga i aquest es posa en aigua calenta a 42° , per tal de fondre la mantega. Un cop aquesta s'hagi fos per complet es centrifuga ràpidament a 3.000 rev. p. m.; el sediment obtingut s'inocula a una sèrie de cobais.

Formatge

Tècnica de Mohler.—Es fan flocs de diferents indrets de la mostra de formatge. Es trituren en un morter estèril i la pasta resultant s'emulsiona amb solució salina estèril; un cop s'ha obtingut una suspensió homogènia es filtra a través de gassa estèril.

Amb el que s'ha filtrat s'inocula una sèrie de cobais, injectant a cada un d'ells el volum de líquid corresponent a 2 gr. de formatge.

Com sigui que s'ha demostrat la possibilitat de vida del bacil de Koch, tant als sòls com a les dejeccions dels animals i als pasturatges, la qual es pot perllongar en el primer cas fins a 178 dies (Maddock) i en el darrer 41 dies, donem la pauta de la investigació en aquests dos casos.

Sòls

Es recullen 100 gr. de terra i es posen en un flascó estèril i després s'hi afegeixen 200 c.c. d'aigua estèril agitant contínuament a fi d'obtenir una emulsió tan homogènia com sigui possible.

Es deixa el tot dues hores a la temperatura del laboratori agitant freqüentment. Fet això es filtren 50 c.c. a través de muselina i la part que s'ha filtrat es centrifuga a 3.000 revolucions durant 30 minuts; es decanta el líquid que sobreneda i al sediment s'hi afegeixen 10 c. c. de solució NaOH + ClOH (preparada de la mateixa manera de què hem fem esment en parlar de la llet), s'agita vigorosament i després es deixa el tot a 37° durant tres hores, tenint cura d'agitar de tant en tant.

Després s'afegeix aigua destil·lada, s'agita de bell nou i es centrifuga a 3.000 rev. p. m., durant 30 minuts. Es decanta i es renta amb

aigua destil·lada, o sia que es repeteix l'operació de què acabem de parlar, fins que no restin traces de clor. Generalment amb dues vegades n'hi ha prou.

El sediment es divideix en dues parts, l'una s'inocula a 2 cobais i l'altra se sembra en medi a base d'ou.

Pasturatges

Es recull el verd de prat i es porta al laboratori estèrilment; se'n fan trossos de 2 a 3 cm. i s'hi afegeix 500 a 1.800 c.c. d'aigua, segons el volum de què es tracta. S'agita sovint i després de filtrar es recullen uns 400 c.c. Aquests es centrifuguen a 3.000 rev. p. m. durant 30 minuts.

Al sediment s'hi afegeixen 10 c.c. de $\text{ClOH} + \text{NaOH}$, i es posa a 37° durant 3 hores (o també SO_4H_2 al 15 % durant 20 minuts) es centrifuga i renten amb aigua destil·lada; es dilueix en solució salina el culot de centrifugació i se n'inocula 1 c.c. a un parell de cobais i de la resta se'n sembren tubs de medi a base d'ou.

RESUMEN

Los autores pasan revista, en forma breve, a diferentes aspectos de la Biología y Bacteriología del bacilo de la tuberculosis, consignando las teorías más nuevas o más universalmente aceptadas y los medios de cultivo y métodos más adecuados a un resultado seguro de la investigación del B. de Koch.

SUMMARY

The authors pass briefly in review different aspects of the Biology and Bacteriology of the bacillus of tuberculosis, stating the most recent theories or those most universally accepted and the means of culture as well as the methods most adequate for getting a sure result of the investigation of the B. of Koch.