

Los cultivos de materiales sospechosos de Tuberculosis, en el diagnóstico de esta enfermedad

Por el Jefe de Trabajos del Instituto de Anatomía Patológica y Parasitología

Profesor FRANZ O. FIELITZ LANDIVAR

El cultivo de materiales sospechosos de tuberculosis, con fines de su verdadera constatación diagnóstica, tiene una importancia capital y carece de dificultad para nuestro laboratorio, puesto al servicio de las clínicas del Hospital.

Cuando tenemos que efectuar un diagnóstico seguro en elementos como expectoración, material fecal, sedimento de orinas, exudados, jugo gástrico, leche, piel y aún en tejido orgánico, ya sean neomembranas de raspado de mucosas, biopsias provenientes de la mesa de operaciones, ganglios, etc., donde la investigación microscópica directa no haya dejado en claro la naturaleza de una infección, el mejor método es el cultivo ya que, la inoculación experimental, en muchos casos con resultado negativo, ha podido constatarse que ha fracasado, pues, con otros métodos de investigación resultaron materiales tuberculosos positivos y esto es de gran importancia cuando son de procedencia humana.

Tales hechos, débense a la vitalidad disminuida de la cepa inoculada, la que ha sufrido verdadero desmedro por el proceso de manipulación a que ha sido sometido, como son por ejemplo, los procedimientos de enriquecimiento, centrifugación etc. y el agregado de desinfectantes (anti-formina, lisol, formalina, etc.), para evitar que la flora microbiana secundaria provoque un proceso infeccioso en el cobayo, etc., pues no se explica como un animal tan sensible que se considera "animal reactivo" no manifieste su exquisita sensibilidad.

La reproducción "in vitro" para la seguridad diagnóstica, es, después de la constatación directa por el microscopio de un material centrifugado y enriquecido, la de mayores garantías de seguridad para el clínico o para el higienista.

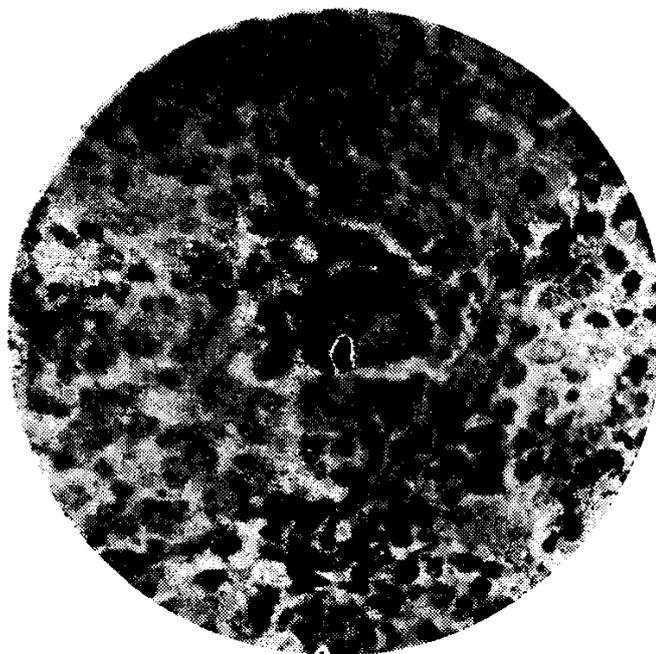
Para la práctica de esta investigación, es necesario tener presente

que se requieren medios especiales en el Laboratorio, aún cuando los encargados de esta investigación no fueren laboratoristas especializados en esta materia.

Para practicar, con éxito, esta investigación, se requiere:

a) Medios artificiales de cultivos adecuados.

Haciendo un poco de historia ilustrativa, Roberto Koch (1882) descubridor del bacilo, propuso el suero de sangre coagulada, al calor a 70°g, procedente del bovino, como medio para el cultivo de tuberculosis bovina y el suero de sangre coagulada de conejo, para la tuberculosis humana. Nocard y Roux introdujeron el uso de la glicerina al medio nutritivo artificial. Stanley, Griffith, Cobbet las propiedades de los sueros normales animales, incluso el suero humano de sujeto indemne. Pawlowski fué



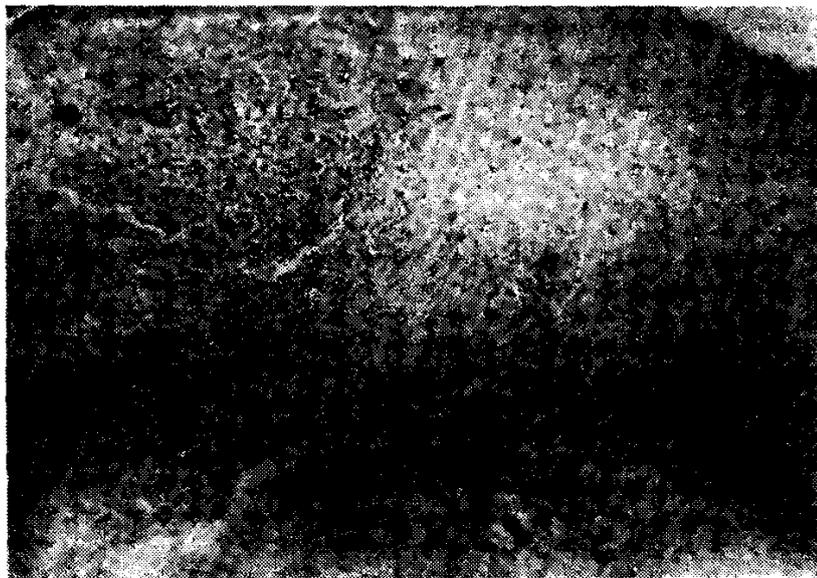
Una célula gigante de un nódulo de tuberculosis bovina.
célula gigante o de Langhans. Mayo 15 de 1947.

el primero que usó la papa como substracto sólido nutritivo del medio; Dorset agregó los medios con huevo, Libenau el caldo de carne o de órgano (sobre todo pulmón) glicerinado al 5 % y otros muchos medios sólidos y líquidos, naturales o sintéticos (sales minerales) extractos, etc., fueron propuestos para cultivar la tuberculosis, lo que demuestra el gran interés que tenían los investigadores en encontrar un medio seguro y qué importancia tenía para ellos, el poder constatar en los mismos, la vegetalidad del bacilo de Koch. Los medios naturales, suero de bovino, conejo, etc., coagulados al calor, son medios de progresión lenta. A las tres o cuatro semanas aparecen colonias blancas, lenticulares, transpa-

rentes, que se hacen escamosas, gruesas y poco adherentes al medio; a medida que crecen llegan a confluír unas con otra. El color de los cultivos de alguna data, es el de "trigo maduro". Se debe desconfiar de las colonias pigmentadas. Los sueros adicimados del 5 % de glicerina coagulados al calor 70 - 75° 10 a 15 minutos, mejoran las condiciones de vegetabilidad de las colonias que aparezcan, siempre que se trate de una cepa humana; la tuberculosis bovina no cultiva o cultiva incidiosamente en este medio; pues no apetece glicerina y suele desaparecer si es que una colonia apareció, al primer momento.

El huevo (clara y yema convenientemente emulsionados) repartido en tubos y coagulados al calor, son un medio natural que da colonias abundantes, después de los 15 días a temperatura de 38° a la estufa.

La papa debidamente alcalinizada a un p.H. de 7.2-7.4 por alcalinización con solución de soda normal con caldo glicerinado (caldo de carne

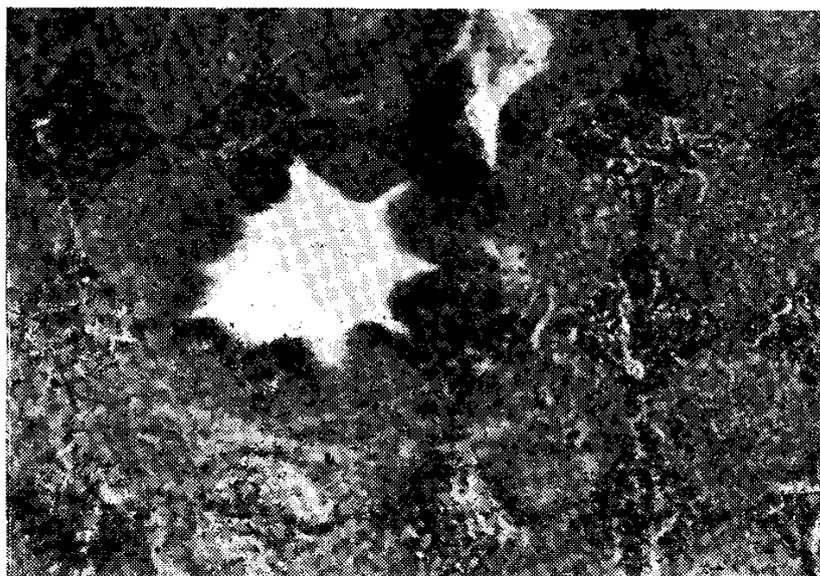


Tuberculosis típica del parénquima bovino. Cordón testicular. Hay células de Langhans. Mayo 15 de 1947.

sin alcalinizar (p.H. 6.4-6.5 más glicerina 5 %) es un buen medio de cultivo, donde progresan entre 8 a 12 días el bacilo de Koch tipo humano, abundantemente, cubriendo el trozo de papa de una capa escamosa de color algo amarillento (trigo maduro) y un velo fuerte sobre la parte líquida del casquete del tubo de Roux; velo superficial que remonta las paredes del tubo y que deja al caldo transparente cuando el cultivo es puro. La papa sin glicerinar con caldo más huevo y glucosa al 2 % es buen medio nutritivo para bacilo bovino.

El problema de los medios de cultivos, ya sean éstos naturales o artificiales para tuberculosis radica en la reacción natural de los elementos

que lo componen, sean estos básicos o ácidos, lo que los vuelve inadecuados para la vegetabilidad de este bacilo que no se aviene a vivir en medios ácidos ni básicos. La adición de álcalis o ácidos para corregirlos desnaturaliza al medio y los hace de difícil adaptación vital para la multiplicación de la cepa sembrada. Por otra parte, los medios nutritivos naturales de suero o de huevo, como los de carne o extracto de carne, cambian el p.H. con la cocción; y la adición de mayor o menor cantidad de solución de ácidos o álcalis no es capaz de normalizar y por lo tanto dejar al medio en las mismas condiciones, como lo son sueros o huevo simplemente coagulado por el calor sin ningún producto sobreagregado. Los iones ácidos o básicos no sabemos como son utilizados por las bacterias o si estos iones se combinan con las sales propias de los elementos nutritivos del medio para formar nuevos cuerpos cuya acción ulterior sobre el



Tuberculosis atípica de parénquima canino. Bronconeumonía caseosa. No hay células de Langhans en los nódulos.
Mayo 15 de 1947

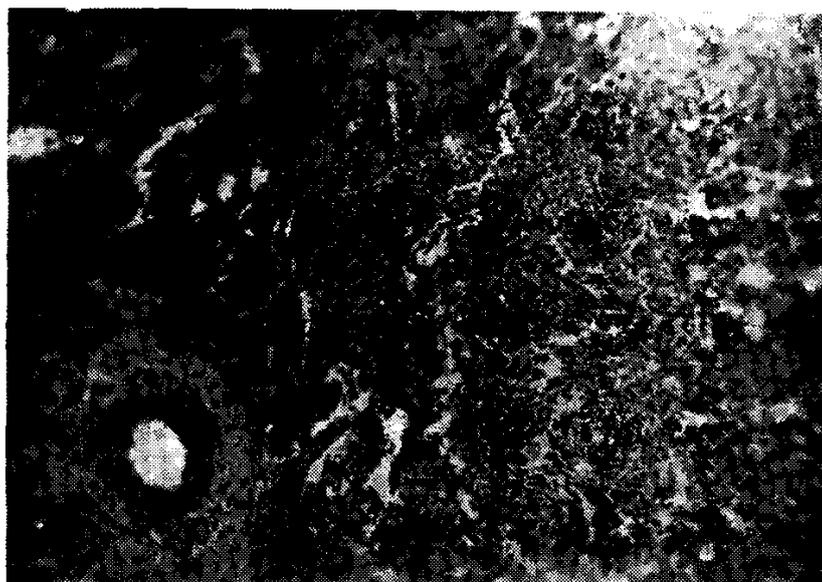
desarrollo de la colonia microbiana puede volverse, por tal causa, intolerable, cuando no tóxica.

Por esta causa debe buscarse un medio que después de haber sufrido el manipuleo del laboratorio conserve una reacción p.H. neutra o muy próxima a ella. Una reacción débilmente ácida (p.H. 6.8 a 7.0) es mejor tolerada que una reacción débilmente alcalina (p.H. 7.4 a 7.8) sobre una reacción óptima neutra de p.H. 7.2 a 7.3.

Para tal fin es recomendable un medio sólido de aislamiento y purificación de la cepa, constituido por tres partes de huevo, clara y yema, convenientemente batidos y una parte de caldo de carne glicerinado al

5 %. La clara y yema deben estar bien mezcladas homogeneizadas, flúidas. Debe hacerse con huevos frescos; pues los de alguna data, pueden tener diferencia de p.H. con el fresco y contener elementos nocivos o tóxicos autoformados, etc., que lo hacen inadecuados para tal uso.

Este medio sólido al calor 70° por 10 a 15 minutos es de rápida vegetabilidad: en 8 a 12 días da colonias a la estufa a 38°. Puede reemplazarse el huevo, por una mezcla de materias nutritivas grasas, alimenticias; por ejemplo, manteca, grasa palmitina, asparaguina, lecitina, leucina, tirosina, aminoácidos, fosfatos de potasio y magnesio y cloruro de sodio. Estos elementos no deben pasar de una proporción de gr. 0,10 ctgr. en la solución de cloruro de sodio al 0.50 ctgr. por 100. Estos elementos se encuentran en su totalidad en la constitución de la yema del huevo. El



Tuberculosis atípica de parénquima canino. Bronco neumonia tuberculosa. No hay caseosis; no hay células de Langhans.
Mayo 15 de 1947

caldo hecho con extracto de carne de Liebig al uno por ciento, más peptona uno por ciento, cloruro de sodio 0.50 ctgr. por ciento en agua destilada neutra sin otro agregado, es de reacción débil ácida, su p.H. es constante e igual a 6-5-6-6.

Esta acidez no influye sobre la cepa sembrada y puede considerarse como una acidez saprofítica, que por ser natural es aceptada por el bacilo tuberculoso. Sobre este caldo de carne puede agregarse huevo batido. La papa debe cortarse en hemicilindros y ponerla en tubos de Roux y esterilizar a 120° por 10 a 15 minutos, contando que la cocción de la misma no llegue a deshacerla o resquebrajarla. La papa bien lavada en agua se atraviesa con un tubo de ensayo del calibre del tubo de Roux

y luego se parte en dos hemcilindros y se sumerge en agua con carbonato de soda para quitarle la acidez natural alta. Luego de una inmersión de 2 horas en agua alcalina se escurre y se las colocan en el mismo recipiente con agua glicerizada al 5 % por 24 horas. Deben quedar sumergidas en la solución glicerizada. Luego se carga cada tubo de Roux con un trozo de tubérculo y se rellenan con caldo al huevo o caldo gluco-glicerizado el espacio inferior del tubo estrangulado de modo que el caldo toque y pueda subir por capilaridad a la papa y mantenerla con el grado de humedad necesaria para que no se seque ni se ennegrezca por acción oxidante o se seque por falta de contacto con el líquido.

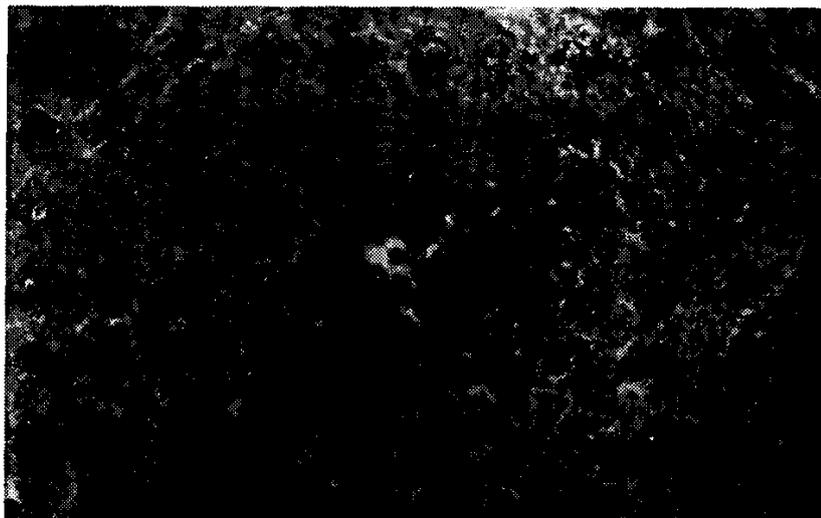
El medio así constituido es neutro o débilmente ácido. Al juntar papa alcalinizada con caldo huevo sin alcalinizar, débilmente ácido, desaparece esta última reacción o queda con una acidez débil saprofítica.



Tuberculosis atípica en parénquima canino. Neumonía caseo gangrenosa tuberculosa. No hay células de Langhans.
 Mayo 15 de 1947

b) Es de gran importancia el cuidado de la estufa y la regulación de la humedad y temperatura de la misma. La regulación de la estufa debe hacerse de tal manera que dentro de los tubos de cultivo, no baje la temperatura de 37,5 a 38° para el bacilo de Koch; de modo que la temperatura a que debe estar regulado el termoestato es de 38°2. Conviene que la estufa esté en un cuarto donde la temperatura sea más o menos constante y cuya ventilación pueda efectuarse sin provocar corrientes de aire o enfriamiento brusco; vale decir que la estufa estará colocada en un ángulo o sobre una de las cuatro paredes de la sala, donde no tengan influencia ni las puertas o ventanas aún cuando éstas deban por necesidad, ser abiertas. Debe procurarse que la atmósfera interior de la estufa tenga un cierto grado de humedad constante; de esta manera

la atmósfera dentro de los tubos y a través de los tapones de algodón: pueda regularse, sin que tengan necesidad de hacerlo evaporando el líquido de constitución de la masa de cultivo o el caldo del casquete inferior del tubo de Roux. De la importancia de la humedad para el progreso de una colonia microbiana, ya sabemos por los conocimientos de patología general y bacteriología que son indispensables: humedad y calor son esenciales para la vegetabilidad de los microorganismos en general. La estufa sin una regulación ambiental húmeda adecuada, pronto provoca la evaporación y sequedad de los tubos sembrados y los gérmenes pronto desaparecen o aletargan sus condiciones vitales. Tratándose de tuberculosis que ya de suyo, es muy lenta la procreación y progresión microbiana, ésta dejaría de efectuarse y muy rápidamente desaparecería por completo.



Tuberculosis atípica de parénquima canino. Esplenitis nodular tuberculosa. No hay en los folículos caseosos células de Langhans. -- Mayo 15 de 1947.

c) El material sospechoso debe ser tratado de la siguiente manera: En una copa cónica (si es flúido o líquido) o en un morterito de vidrio o de porcelana, bien desinfectados por alcohol yodado y lavado con alcohol rectificado para quitar el yodo, se mezcla o se tritura hasta hacer un puré fino, unos cuantos gramos de material sospechoso, usando suero fisiológico fresco y estéril en cantidad de unos pocos centímetros cúbicos, para formar una masa homogénea o un líquido de un volumen determinado, por ejemplo, en ambos casos, una mezcla de 20 c.c. de líquido problema. Se le agrega 1 c.c. de solución de ácido sulfoírico al 12 %, se mezcla bien y se deja reposar por 20 o 30 minutos. Luego se reparte en tubos cónicos de centrifugar esterilizados al calor de 250° seco o en el autoclave 120° 5 minutos tapados con algodón. Se decanta el líquido luego

de centrifugado y se diluye el depósito en igual cantidad de suero fisiológico estéril y se centrifuga de nuevo. Luego se hace, por segunda vez esta operación, con lo cual se ha quitado por lavado del sedimento toda acción a la solución sulfúrica. Luego con pipeta Pasteur o con pipeta fina estéril se reparten los sedimentos a los tubos con papa prontos para ser cultivados.

Los tubos luego de sembrados deben ser rotulados con la fecha y datos de siembra, deben ser flambeados los tapones y puestos en posición inclinados contra el borde de una gradilla acostada, para que el caldo bañe a la papa por debajo de la cara de siembra, en toda su extensión y para que el agua de condensación y de evaporación, escurra y se ponga en contacto con el cultivo de inmediato. No deben moverse de esta posición hasta que transcurran 4 semanas y el cultivo tenga vigor y luego deben ser repicados a otros tubos, todos los meses. Debe evitarse lo más posible, la luz, las corrientes de aire y los cambios de temperatura en la estufa.

De esta manera hemos podido diagnosticar tuberculosis, en materiales, donde las pruebas de observación directa al microscopio fueron positivas y también en casos en que la observación de varios frotis bien coloreados y bien investigados dieron pruebas negativas. También hemos constatado la presencia de tuberculosis, en lesiones que, aparentemente no tenían las características de la clásica tuberculosis y habían sido diagnosticadas como lesiones inespecíficas.

Montevideo, abril 11 de 1947.