

Bacterias no ácidorresistentes halladas en materiales tuberculosos y en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* *

POR EL DR. A. ARENA

En la literatura bacteriológica de la tuberculosis se encuentran registradas un cierto número de publicaciones que tratan del hallazgo de formas no ácidorresistentes relacionadas con el *Mycobacterium tuberculosis*.

Para citar algunas relativamente recientes, recordaremos que MORTON KAHN¹, por medio de siembras unicelulares, ha tenido oportunidad de apreciar transformaciones morfológicas no ácidorresistentes de este microbio, las cuales abarcan desde el finísimo gránulo y el coco hasta el mismo bastón y que según M. K. deben considerarse como partes integrantes del ciclo evolutivo del bacilo de Koch. MELLON², que también hace análogas observaciones, se debate a su vez en la disyuntiva que importa el atribuir tales modificaciones a un estado evolutivo o a un proceso involutivo del nombrado microorganismo. SANARELLI y ALESSANDRINI³, consiguen ver gránulos no ácidorresistentes y semiácidorresistentes, en los ganglios tráqueobrónquicos de los cavia en cuya cavidad peritoneal habían colocado sacos de colodión con virus tuberculoso. Asimismo, en otro de sus importantes trabajos, refieren la observación de gránulos, bacilos y cuerpos globoides (situados en la cavidad externa de los sacos de colodión de doble pared, colocados tanto en los medios nutritivos como en el abdomen de los animales utilizados en sus experimentos sobre tuberculosis) y denominados por estos AA. « protógenos tuberculosos ». H. MÖLGAARD⁴, considera a los gérmenes no ácidorresistentes relacionados con tuberculosis y al denominado « ultravirus » como expresiones de la concomitante infección con el *Actinomyces albus* descrito por él, la cual según M. acompaña siempre a las infecciones tuberculosas. Para MÖLGAARD, los cocos y difteroides que aparecen en los cultivos de material tuberculoso, no serían más que las formas conidiales del mencio-

* Trabajo del Instituto Bacteriológico (D. N. H.) y del Instituto de Tisiología (Universidad de Córdoba).

¹ MORTON C. KAHN, *American Review of Tuberculosis*, XX, n° 2, agosto 1929.

² R. R. MELLON y col., *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, XXX, 80-82, octubre 1932.

³ G. SANARELLI y A. ALESSANDRINI, *Etudes sur l'ultravirus tuberculeux* (Première mémoire). « *Annales de l'Institut Pasteur* », XLVIII: 144-178. Paris, 1932.

— — *Etudes sur l'ultravirus tuberculeux* (Deuxième mémoire). *Les protogènes du virus tuberculeux*. « *Annales de l'Institut Pasteur* », L: 167-221. Paris, 1933.

⁴ *Beit. z. Klinik d. Tuberk.*, LXXXV, 616.

nado actinomiceta. S. J. MAHER⁵, ha dado últimamente a luz, con el título de « Progenie del bacilo tuberculoso », un trabajo donde asegura que, mediante la adición de leche tornasolada, en los cultivos del bacilo de Koch se observa el desarrollo de cocos y diplococos (lo mismo en la siembra inicial que en los subcultivos) a los que designa « pseudoneumococos »; afirmando además que en la génesis de estos últimos tienen una gran importancia los gránulos del bacilo de Koch.

Por nuestra parte, es desde mucho tiempo atrás que venimos dedicando preferente interés a esta cuestión particularmente ligada al problema más general y controvertido del polimorfismo o mutabilidad del *Mycobacterium tuberculosis* y — precisamente en base a los fenómenos observados ya en la época de nuestros trabajos comprobatorios de la teoría de FERRÁN (cuyos resultados fueron negativos)⁶ o bien más recientemente en el Instituto Bacteriológico y, ahora, en el Instituto de Tisiología de la Universidad de Córdoba (Argentina), en el curso o desarrollo de las labores de investigación bacteriológica de asuntos vinculados con el problema de la tuberculosis humana y animal — hemos llegado al firme convencimiento, día a día más arraigado, de que en Microbiología no poseemos todavía un claro concepto biológico del bacilo de Koch.

En este primer relato nos limitaremos a exponer escuetamente: § 1. Las comprobaciones efectuadas al examinar rutinariamente el estado de pureza de la vacuna BCG. § 2. Los datos obtenidos al trabajar materiales tuberculosos o presuntos de tales con propósitos de investigación o con fines diagnósticos. § 3. Los resultados conseguidos al ensayar la bondad de un nuevo medio de cultivo a base de albúmina de huevo, preparado por el ayudante D. CARLOS ACUÑA, que denominaremos en adelante A. A. (agua de albúmina). § 4. La descripción de los cultivos de bacterias cocoides logrados por siembra directa de diversos materiales tuberculosos en medios nutritivos comunes. § 5. Las observaciones recogidas al verificar el citado trabajo de MAHER.

§ 1.

En algunos tubos de agar común en estría, sembrados con vacuna BCG. e incubados a 37°C y sin desarrollo hasta las 48 horas siguientes, comprobamos generalmente que una vez transcurridos unos 15 días de incubación a esa temperatura, existía un escaso desarrollo situado en la parte del medio nutritivo que había estado en contacto con el agua de condensación del tubo, a la sazón evaporada. El estudio microscópico permitía reconocer que dicho desarrollo estaba constituido principalmente por un microorganismo con forma de coco (cocoide), dispuesto de a dos, en tetradas o en cadenas cortas de diplococos, no ácidorresistente y que respecto del método de Gram se comportaba irregularmente; veíase también, bacios de morfología muy modificada, de ácidorresistencia disminuida, pero el número de estos últimos no correspondía, « grosso modo », al que contenía la muestra sembrada de la vacuna BCG.

§ 2.

Durante los estudios efectuados para aislar el *Mycobacterium tuberculosis* en los nódulos de eritema nudoso⁷, al revisar las extensiones de substancia gan-

⁵ *The Amer. Review of Tuberculosis*, pág. 350, 1935.

⁶ A. ARENA. *Estudio sobre la vacuna de Ferrán*. Actas del Primer Congreso Panamericano de la Tuberculosis, tomo II, págs. 486-496. Córdoba 1927 y « La Semana Médica », XXXIV, n° 47, 1.454 - 1.459. Buenos Aires 1927. (Trabajos iniciados en 1924).

⁷ Ver: R. CIBILS AGUIRRE, *Comprobación experimental de la etiología tuberculosa del eritema nudoso* (comunicación previa). « La Semana Médica », XXXVIII, n° 49, pág. 1.674-1.675. Buenos Aires, 3. XII. 1931 (protocolo de A. ARENA y R. SORDELLI).

A. ARENA. *Sobre la presencia del « Mycobacterium tuberculosis » en los nódulos de eritema nudoso*. « Folia Biol. », n° 31-32-33, págs. 146-147. Buenos Aires, octubre-diciembre 1933. Leer también otros posteriores trabajos clínicos de R. CIBILS AGUIRRE.

gliconar de cavia de pasaje, muertos o sacrificados, y coloreados por el método de ZIEHL-NEESEN, era frecuente observar la presencia de gránulos ácidos-resistentes, de formas naviculares con tinte negruzco, así como de gránulos y cocoides no ácidos-resistentes con las características ya descritas. Otro tanto nos fué posible comprobar en los extendidos de médula ósea de un niño de 4 meses fallecido de tuberculosis generalizada*.

En Córdoba, por otra parte, podemos decir que no transcurrió día sin que estos elementos cocoides fueran vistos en las preparaciones que para fines diagnósticos se confeccionaban utilizando líquidos de punción, orinas, pus de abscesos, partículas tisulares de lesiones cutáneas y esputos (especialmente en algunos de estos en los cuales la bacterioscopia no servía para poner de manifiesto la existencia de bacilo de Koch).

Cabe por lo demás aclarar que estos casos particulares del hallazgo del referido cocoides no son más que unos pocos ejemplos entre muchos: pues nos permitimos asegurar que no hay bacteriólogo que, en la práctica de sus tareas de laboratorio sobre tuberculosis, no haya visto siquiera una vez formas microbianas similares.

§ 3.

Los resultados conseguidos empleando el medio AA. (ver página 223) pueden resumirse así:

Material de siembra. — Cultivos en película desarrollados en medio de SAUTON sembrado con cepas BCG. y bovina VALLÉE.

El estudio bacterioscópico de este material nos reportó los datos siguientes: ZIEHL-NEESEN (decoloración con alcohol clorhídrico): grupos de bacilos ácidos-resistentes granulados contenidos en una «magma» finamente granulosa y teñida de azul claro**; bacilos ácidos-resistentes libres y aislados: gránulos negruzcos: granulitos apenas visibles, teñidos débilmente por el azul de metileno y muy escasos bacilos cortos, no ácidos-resistentes, en cuyo interior comprobábamos la presencia de alguno que otro gránulo semi-ácidoresistente. FONTES: formaciones granuladas extra o intrabacilares, bien destacadas. No podemos decir si entre ellas se encontraban los mencionados gránulos. GRAM-KOPELOFF: muy pocas formas bacilares francamente positivas. Granulaciones Gram positivas muy escasas y de menor tamaño que las que se tiñen con el método de FONTES. Abundantes formas bacilares Gram negativas y escasos diplococos que resaltaban entre la gran cantidad de gránulos de variado tamaño, todos (bastones, cocos y gránulos) teñidos por la solución diluida de fucsina.

Caracteres de los cultivos. — Los balones sembrados se incubaban a 37°C. En el transcurso de los 3 primeros días los cultivos no presentaban otra particularidad que aquella de que los bacilos constituyentes aparecían más gruesos y largos, mientras los gránulos negruzcos, que se comprobaban con el método de ZIEHL-NEESEN, eran más evidentes. En el 4º día uno de los balones sembrado con cepa BCG. presentó una marcada turbidez y el examen bacterioscópico reveló la existencia de islotes de bacilos ácidos-resistentes y de abundantes formas cocoides (libres; en placas; de a dos, cada una con aspecto de riñón; o dispuestas en cadenas cortas de elementos alargados y también en tetradas). Tales elementos se hallaban rodeados por un halo rosado o por una cápsula (?) teñida de azul. Con el método de FONTES los cocoides se coloreaban de violeta: pero lo que más nos llamaba la atención con este último método, era el hecho de que la mayor parte de las formas bacilares presentaban un menor número de gránulos. Con el método de GRAM estos cocoides se comportaban irregularmen-

* Las cepas de bacilo tuberculoso aisladas por cultivo de material procedente de las lesiones encontradas en la obducción de este niño, serán en adelante designadas = M. F.

** Substancia cianófila de BEZANÇON y PHILIBERT.

re: sin embargo, conviene decir que aquellos que más resistían a la decoloración tenían un tamaño mayor y un color violeta casi uniforme.

En la mayor parte de los demás balones sembrados con BCG, pudimos comprobar estos mismos elementos, solo entre el 8º y 15º día desde la siembra; pero quedaron algunos en los cuales las formas cocoides no fueron halladas.

Los trasplantes en agar común y caldo de carne, efectuados con el desarrollo obtenido en el medio AA., mostraron, a las 24 horas, finas colonias discoidales, ligeramente opacas, en el primero de los medios nutritivos nombrados, mientras en el segundo había un ligero enturbiamiento. Los preparados nos demostraron la existencia de pequeños racimos, constituidos por cocos, con un centro azul fuerte y una periferia azul clara, cuando se empleaba el método de ZIEHL-NEELEN, observándose que entre los cocos había finas granulaciones rojas (ácido-resistentes). Los métodos de FONTES y de GRAM no nos permitieron agregar más detalles que los aquí descriptos.

En los días subsiguientes las colonias aumentaron de tamaño y opacidad adquiriendo un color blanquecino, ligeramente amarillento. A su vez, en el caldo se fué formando un depósito que, por agitación, se levantaba formando un filamento grueso fuertemente adherido al fondo del tubo. El examen microscópico reveló entonces elementos dotados de iguales características morfológicas a las ya expuestas.

Inoculaciones. — Después de haber practicado más de 10 subcultivos en los mismos medios nutritivos, hicimos una emulsión de una asa del desarrollo en agar en 10 c³ de agua destilada y, con 0.2 c³ de ella para cada animal, se inocularon conejos y cavia por vía venosa. Algunos de los cavia murieron, más o menos después de 30 días, en estado de caquexia. La obducción nos mostró la hipertrofia de los ganglios linfáticos (en uno de estos animales el ganglio axilar tenía el tamaño de una habichuela); un derrame peritoneal y congestión pulmonar con algunos pequeñísimos nódulos de color blanco grisáceo, diseminados en el parénquima de los pulmones. El estudio de los extendidos confeccionados con substancia ganglionar reveló el mismo microbio inoculado. La coloración de ZIEHL-NEELEN dió resultados negativos.

Con triturado de ganglio linfático y de un trozo de pulmón de uno de estos cavia, inoculamos, entonces, otros dos animales de la misma especie, por vía subcutánea. Uno de ellos murió, antes de los 30 días, en estado caquético y en la obducción hallamos derrame peritoneal, congestión pulmonar, esplenomegalia y ganglios linfáticos hipertrofiados. Los preparados denunciaron la existencia del mismo cocoides inoculado. El segundo cavia, así como también los pertenecientes a la serie inoculada con cultivo, fueron sacrificados a los 3 meses. Todos se hallaban en buen estado de nutrición y en la obducción mostraron un marcado aumento de volumen de los ganglios linfáticos (especialmente axilares), bazo grande con foliculos de MALPIGHI bien marcados y, en algunos animales, vimos un fino puntillado blanquecino en el hígado. Los preparados nos permitieron siempre poner de manifiesto la existencia del mismo microbio.

Los conejos fueron sacrificados a los 3 meses. Presentaron esplenomegalia e hipertrofia de los ganglios tráqueobrónquicos. En los preparados confeccionados con substancia de estos órganos observamos únicamente la existencia del microorganismo inyectado.

§ 4.

Como también los ensayos realizados con el cocoides aislado del desarrollo conseguido en los balones de medio AA. sembrados con cepa bovina VALLÉE, dieran resultados análogos a los obtenidos con aquel procedente de cultivos de la cepa BCG., pensamos entonces en la posibilidad de lograr lo mismo con los cocoides que pudiéramos aislar directamente de lesiones o de material tuberculoso.

De acuerdo a este plan, aislamos el referido cocoide de la sangre, hígado y bazo de conejos tuberculizados que se sacrificaban momentos antes de la siembra; de esputos, orinas, líquidos pleurales, sangres de tuberculosos y de las lágrimas de una niña atacada de conjuntivitis flictenular; de ganglios de cerdos y de bovinos tuberculosos: siempre mediante cultivos por siembra directa en agar común y caldo de carne, o, en algunos casos, tratando previamente el material por ácido sulfúrico al 5 %, por un tiempo de 15 a 20 minutos, y sembrado después en medio de Loewest ein.

Este último hecho nos sugirió la idea de que el cocoide en cuestión resistiera a la acción del ácido sulfúrico. Ensayada la resistencia de las emulsiones de los distintos cultivos que poseíamos, coprobamos que los microbios (cocoïdes) de éstos mantenían la propiedad de multiplicarse después de haber estado en contacto con dilución de ácido sulfúrico hasta un 3 % y que, en cambio, los resultados eran inconstantes para concentraciones de un 5 %.

En todos los casos de siembra con los materiales enumerados, no obtuvimos siempre el mismo tipo de colonia: pues si en la mayoría de ellos éstas tenían el aspecto mencionado, algunas veces encontramos también colonias de borde festoneado y de color amarillo, cuyo examen microscópico nos demostraba, no obstante, que estaban compuestas de microorganismos con las mismas características morfológicas correspondientes a los microbios que constituían las colonias blancas.

Después de unos 10 transplantes con cada una de las cepas aisladas del cocoïde, inoculamos diversos lotes de cavia con emulsiones de bacterias correspondientes a colonia blanca y a colonia amarilla, utilizando las vías intraganglionar, peritoneal y subcutánea. Los resultados fueron semejantes a los que ya hemos referido acerca de las inoculaciones practicadas con el cocoïde aislado de las cepas cultivadas en medio AA. (BCG. y bovina VALLÉE); salvo la diferencia de que en algunos casos se anotó una franca pericarditis.

La circunstancia de que no en todos los balones de medio AA. sembrados con una misma cepa (ver § 3) se consiguiera el desarrollo del cocoïde; aquella otra de que de las siembras en medios nutritivos comunes se lograsen colonias de tipo distinto y la consideración de que las pruebas de aglutinación efectuadas con suero antituberculoso fuesen poco halagadoras (títulos de 1/50 y en algunos casos 1/100); nos hizo pensar en la posibilidad de que las bacterias cocoïdes aisladas respondieran más bien a infecciones originadas por microbios muy difundidos en la naturaleza. Pero tampoco nos conformó mucho esta momentánea explicación, debido a que, algunas veces, habíamos aislados tales cocoïdes partiendo de cultivos de bacilo tuberculoso que presentaban todas las características de un cultivo puro.

§ 5.

La lectura del artículo de MAHER⁸, nos suministró una técnica definitiva, cuya aplicación, según el mencionado autor, permite el desarrollo de cocos y diplococos no ácidosresistentes, semejantes al neumococo, en cualquier cultivo de bacilo tuberculoso. El método preconizado consiste en agregar 50 c³ de leche tornasolada a los 150 c³ de caldo glicerinado donde ya hay desarrollo de bacilo de Koch, y mantener el cultivo, desde este momento, a temperatura ambiente. Al repetir el trabajo de MAHER con dos cepas tuberculosas (BCG. y M. F. *), hemos podido comprobarlo con la sola discrepancia de que los gérmenes desarrollados en nuestros cultivos, mediante el agregado de la leche tornasolada, no presentaban grandes semejanzas con los neumococos y sí, en cambio, con los elementos que en esta exposición denominamos cocoïdes.

⁸ Loc. c. en la llamada 6.

* Ver la llamada indicada con un asterisco en la pág. 224.

Además hemos conseguido reemplazar la técnica de MAHER por la siguiente: En pequeños balones con perlas de vidrio, se colocan 10 cg. de cultivo de bacilos de Koch (retirados de película desarrollada en medio líquido o de colonias crecidas en medio sólido); luego se agita hasta obtener la desaparición de los grumos gruesos y por último se agrega 20 c³ de suero de leche de PETRUSCHKY. Estos balones pueden incubarse a 37°C o a temperatura ambiente, aunque los resultados nuestros indican que el crecimiento es más constante y seguro en aquellos mantenidos a la temperatura de laboratorio.

Esta modificación fue ensayada así:

Material de siembra. — a) Cultivos aislados de esputos tuberculosos que llevaban 6 pasajes en el medio de LOEWESTEIN en el momento de utilizarse; b) BCG. cultivado en medio de SAUTON; c) Cultivo en caldo glicerinado de la cepa M. F.

Antes de sembrar las muestras de estas cepas, hicimos con ellas cultivos en caldo de carne y en agar común, pero no se obtuvo desarrollo hasta los 15 días de permanencia en la estufa.

El estudio bacterioscópico de este material nos reportó los datos siguientes: ZIEHL-NEELSEN: formas bacilares ácidosresistentes, granuladas en su mayor parte (observándose especialmente entre estas últimas, sobre todo en los manojos pequeños, gránulos de color azul muy pálido, apenas perceptibles, que se disponen a manera de pequeños diplococos) y escasos bacilos, muy pequeños, teñidos de azul. GRAM-KOPELOFF (empleando una doble concentración de fucsina): escasas formas granuladas Gram positivas y un menor número de éstas teñidas uniformemente por el violeta; abundantes bacilos rosados y, en número variable, gránulos, pequeños cocos (a veces diplococos reniformes), así como también pequeños bacilos en rosa pálido. Pero el hallazgo de tales elementos (gránulos y cocos) no es general para todos los cultivos utilizados³.

Caracteres de los cultivos. — Utilizando nuestra modificación del medio preconizado por MAHER y empleando las referidas cepas de cultivo de bacilos

³ La coloración negruzca de los gránulos (ver § 2), obtenida por el método de ZIEHL-NEELSEN, fué interpretada por el Dr. SAYAGO (Director del Instituto de Tisiología de la Universidad de Córdoba), a quien en más de una oportunidad hemos mostrado nuestros preparados, como una posible superposición de colores. En lo que a estos gránulos negruzcos se refiere, pudimos comprobar lo contrario haciendo una coloración de ZIEHL, sin emplear el azul de metileno. Pero, sin embargo, este método nos permitió apreciar, entre los grupos de cocoides, la existencia de algunos de estos últimos elementos cuya decoloración, por la mezcla alcohol-ácido clorhídrico, no es completa, lo cual no es obstáculo para que, cuando se emplea coloración de fondo con azul de metileno, aparezcan teñidas con este colorante. Desde este hallazgo, siempre hemos realizado conjuntamente preparados con ZIEHL-NEELSEN completo y otros sin coloración de fondo. Además, en un caso de un cocoides obtenido por siembra directa de substancia procedente de úlceras cutáneas de un tuberculoso, en medio de LOEWESTEIN, previo tratamiento por ácido sulfúrico durante 20 minutos, conseguimos comprobar que los cocoides que se teñían de azul cuando empleábamos la coloración de fondo, sin ésta eran perfectamente ácidosresistentes.

Para evitar una posible superposición de colores en la tinción de los cocoides, procedimos de acuerdo al método siguiente: violeta KOPELOFF, calentado hasta desprendimiento de vapores, durante 2 minutos; enfriamiento; lavado con agua; decoloración con alcohol clorhídrico al 4 % o con ácido nítrico al 25 %; nuevo lavado y coloración de fondo con una solución de rojo neutro (2 cm³ de solución saturada de este colorante en 100 cm³ de agua destilada). Con este procedimiento en los preparados cultivos de bacilo tuberculoso se observa: abundantes bacilos color violeta, aparentemente de mayor tamaño que los teñidos con ZIEHL-NEELSEN, cuyos espacios claros toman un débil color *sui generis*, atribuible a la mezcla cromática del violeta y el amarillo; en cuanto a los elementos no ácidosresistentes que suelen observarse en los preparados de cultivos puros de bacilos tuberculosos teñidos por el método de ZIEHL-NEELSEN en esta nueva técnica no aparecen. En cambio los cocoides de los cultivos, que con la coloración clásica se teñen de azul, con este otro método se presentan con una coloración violeta borroso en su centro y un tinte amarillo en la zona periférica, que así tiene límites netos.

tuberculoso, consideradas puras, hemos obtenido en todos los casos el desarrollo del microbio que en este relato hemos denominado cocoide. Este elemento no aparece antes del 4º día, pero si su hallazgo no acontece en un tiempo uniforme para todas las cepas estudiadas, esto no obstante es posible demostrar seguramente su existencia a partir del 20º día siguiente a la fecha de siembra.

Antes de la aparición de los coccoides, los bacilos tuberculosos sembrados, sufren modificaciones morfológicas importantes (bacilos aislados de mayor tamaño y con gránulos internos más evidentes; grumos bacilares en los cuales ya no es posible observar las formas bastón de sus microbios constituyentes, porque están transformados en placas ácidorresistentes, en cuya área se destacan conglomerados de gránulos negruzcos, entre los cuales se advierten grandes diplococos reniformes con ese mismo tinte). Más tarde, las placas que hemos descrito en el paréntesis anterior, pierden paulatinamente su ácidorresistencia y en ellas aparecen innumerables gránulos, de forma poco definida, teñidos de azul por el ZIEHL-NEELSEN y de violeta claro cuando se emplea la técnica nuestra (ver llamada 9 de la página 227): así como también bacilos no ácidorresistentes, teñidos de azul por el ZIEHL-NEELSEN o de amarillo con el nuevo procedimiento de coloración descrito.

Por último, llega un momento en el cual se aprecia toda la gama de formas bacterianas señaladas en el § 1 y § 2. Pero nos ha llamado sobremanera la atención las formas de diplococos semi-ácidorresistentes y los bacilos no ácido-resistentes, en cuyo interior veíamos nítidamente un gránulo que mantenía dicha propiedad. Debiendo recalcar que estos elementos no se apreciaban en las preparaciones de los cultivos originales cuando eran teñidas por el ZIEHL-NEELSEN, mientras se ponían en evidencia cuando se coloreaba con nuestro método, aunque aparecían de mayor tamaño. Otra observación que nos pareció interesante fue la presencia de gránulos azules en los extremos de los bacilos ácidorresistentes.

Ahora bien, en los cultivos donde el cocoide desarrolló con mayor anticipación, nos fué posible verificar, después de transcurridos 30 días, la aparición de cocos Gram positivos muy grandes, en los cuales comprobábamos la existencia de una formación que podía compararse a un brote, y que se teñía de color rojo. Estas mismas pequeñas masas esferulares, cuando coloreadas por el método que emplea al rojo neutro como color de fondo, se teñían lo mismo que los coccoides.

Cuando los preparados de estos cultivos se tiñen con el método de Gram, puede también observarse formas difteroides no ácidorresistentes, las cuales con el método del rojo neutro presentan en su interior las mismas características ya expuestas al referirnos a los grandes cocos.

Por último debemos advertir que todas las formas descriptas por nosotros, fueron observadas también en los balones testigos que se habían dejado capuchonados y examinábamos en los tiempos oportunos.

CONCLUSIONES

1º Este relato tiene por objeto dar a conocer las técnicas que permiten llegar a obtener el cultivo de bacterias coccoides partiendo de cultivos puros de *Mycobacterium tuberculosis*.

2º Acerca de la interpretación bacteriológica de estos elementos coccoides, todas las hipótesis, tanto las ya señaladas por otros autores como también cualquier otra, nos parecen prematuras y todavía no justificables en base a los resultados expuestos.

3º La detallada exposición que acabamos de hacer está destinada a facilitar las investigaciones de comprobación y las que pueden realizarse utilizando como punto de partida los datos comunicados.