

Estudos sobre a tuberculose

pelo

Dr. A. Fontes,

Assistente no Instituto.

Etudes sur la tuberculose

par le

Dr. A. Fontes,

Assistent à l'Institut.

I

Introdução: Considerações gerais e sumarias sobre a terapeutica e imunidade da tuberculose.

Auzencia de sôros especificos. Razões que a explicam. Toxinoterapia Reabsorção dos germens: por via venozas, por via linfatica (cazo particular da via intestinal). Imunidade natural para a tuberculose; razões de ordem quimica que a explicam. Orientação seguida. Investigações sobre a natureza das cêras e gorduras extraidas do bacilo. Saponificação pelos alcooles — Fenomeno da acido rezistencia; diagnostico diferencial microscopico entre tuberculozos e pseudo tuberculozos. Estudo das granulações bacilares, sua eletividade para o Gram. Forma granular de Muchs como forma de rezistencia.

Existencia de fermento hidrolizante no ganglio tuberculoso — Extração do fermento — Diminuição do numero de bacilos da tuberculose *in vitro* em virtude desse fermento — Saponificação da cêra dos bacilos por meio desse fermento.

O capitulo — Tuberculose — em patolojia tem sido investigado quazi que sob todos os aspetos e, se é verdade que as conquistas da ciencia são nelle numerosas, não é menos real que muito pouco tem sido obtido em relação á terapeutica e á imunização. E' que aí, como geralmente se reconhece, intervem como fator de preponderancia quazi absoluta, o terreno em que evolve a infeção e que pela imperfeição dos metodos atuais de investigação, permanece enigma insolavel, ocultando reações de ordem quimica que a razão

I

Introduction: Considérations générales et sommaires sur la thérapeutique et l'immunité de la tuberculose.

Manque de sérums spécifiques — Raisons qui l'expliquent. Toxinothérapie — Réabsorption des germes: par voie veineuse, par voie lymphatique (cas particulier de la voie intestinale). Immunité naturelle contre la tuberculose: Raisons d'ordre chimique qui l'expliquent. Orientation suivie. Recherches sur la nature des cires et des graisses extraites du bacille. Saponification par les alcalis — Phénomène de l'acide résistance; diagnostic différentiel microscopique entre les bacilles tuberculeux et les pseudo-tuberculeux. Etude des granulations bacillaires. Son électivité pour le Gram. Forme granulaire de Muchs comme forme de résistance.

Présence d'un ferment hydrolysant dans le ganglion tuberculeux — Extraction du ferment — Diminution du nombre des bacilles de la tuberculose *in vitro* en vertu de ce ferment — Saponification de la cire des bacilles au moyen de ce ferment.

Le chapitre — tuberculose — en pathologie a été considéré sous presque tous ses aspects, et si vraiment les conquêtes de la science sont à cet égard très nombreuses, il n'en est pas moins vrai qu'au point de vue de la thérapeutique et de l'immunisation les résultats obtenus n'ont pas été bien grands.

C'est qu'alors intervient comme facteur prépondérant, presque absolu, le terrain où évolue l'infection et qui, par l'imperfection des méthodes actuelles d'investigation, reste une énigme indéchiffrable, que cache des

prevê que se processam, tornando o meio improprio á vida do bacilo infetante.

De acôrdo com as belas conquistas da soroterapia na generalidade das infeções e por analogia dellas, tudo tem sido feito em relação á tuberculose e, apoz um curto periodo de esperanças, tudo tem fracassado. Via que foi aberta pelas investigações de Richet e Héricourt, perlustrada mais tarde por Maragliano e Marmoreck, conta no entretanto numerozissimos colaboradores que, por premio só têm obtido a dezilusão lançada pela clinica.

A toxinoterapia, proposta por Koch, empregada hoje em dia com mais criterio, por ser melhor conhecida, daria resultados absolutamente concludentes, se não existira um *quid* que os experimentadores não têm podido explicar e que consiste na faculdade do organismo tuberculoso reagir *beneficamente* á inoculação da tuberculina, faculdade que em determinados cazos, infelizmente raros, transformam a intervenção do medico em intervenção quazi milagroza. No emtanto o numero de cazos em que o tratamento não aproveita é grande e bastantes vezes são rejistados insucessos. Entra em ação o fator terreno, que quando modificado prepara o sucesso do tratamento especifico (regimen de sanatorios). Falta ás tuberculinas qualquer coiza que facilite seu mister terapeutico; as tuberculinas destróem o tecido tuberculoso; o bacilo, porém, permanece intato quando libertado.

O mesmo insucesso geral permanece no terreno das investigações sobre imunidade na tuberculose. Desde as inoculações de culturas de bacilos acido-rezistentes banais ás de adenopatias escrofulozas até as injeções de culturas de tuberculose atenuadas por numerozissimos processos, e entre esses, até aquelle que mais tem prendido a atenção dos especialistas, a bovo-vacina de Behring, quando muito mostram esses metodos a *possibilidade de se obter um aumento de rezistencia do organismo experimentado á inoculação de dóze de bacilos seguramente infetante*. A questão da via de introdução tem sido tambem

réactions d'ordre chimique que la raison nous permettra de prévoir, en rendant le milieu improprie à la vie du bacille infectant.

Encouragée par les belles conquêtes de la sérumthérapie dans la plupart des infections, et en employant des procédés analogues la médecine moderne a tout fait pour la tuberculose; mais, après une courte période d'esperances, tous les résultats ont été négatifs. Ces travaux commencés par les recherches de Richet et Héricourt, enrichis plus tard par Maragliano et Marmoreck, comptent cependant un grand nombre de collaborateurs qui n'ont recueilli que désillusion comme prix de leurs efforts.

La toxinothérapie, proposée par Koch et employée avec plus de soin aujourd'hui qu'elle est mieux connue, donnerait des résultats tout à fait concluants s'il n'y avait un *quid* que les expérimentateurs ne sont pas arrivés à expliquer; à savoir, la propriété qu'ont les organismes tuberculeux de réagir favorablement sous l'effet d'une inoculation de tuberculine; propriété qui, en de certains cas, malheureusement trop rares, transforment l'intervention du médecin en une intervention presque miraculeuse. Mais, l'effet du traitement ne se produit que rarement et l'on compte jusqu'aujourd'hui un grand nombre d'insuccès. Le facteur terrain entre en jeu; lorsqu'il est convenablement modifié, il prépare le succès du traitement spécifique (régime des sanatoriums). Il manque aux tuberculines un je ne sais quoi qui facilite leur action thérapeutique; elles détruisent le tissu tuberculeux, mais le bacille, reste intact, une fois libre.

Le même insuccès général se fait sentir sur le terrain des recherches sur l'immunité de la tuberculose. Si nous considérons les inoculations de cultures de bacilles banaux résistants aux acides jusqu'à celles d'adénopathies scrofuléuses et de cultures de tuberculose atténuées par de nombreux procédés, parmi lesquels celui qui a le plus attiré l'attention des spécialistes, la bovo-vaccine de Behring, nous verrons que ces méthodes prouvent tout au plus la possibilité d'obtenir une augmentation de résistance de l'organisme, soumis à l'inoculation d'une dose de bacilles sûrement infectante. La

explorada; via intra-venoza (Behring), via intestinal (cazo particular da via linfática) (Calmette), têm dado resultados que, no entanto, mostram sempre que a reabsorção do bacilo não se faz facilmente e que na maioria das vezes ella não se observa, permanecendo os bacilos intatos. Isto explica o insucesso da soroterapia ainda que incluídos na célula fagocitária.

E a razão desse fenomeno existe na estrutura química do bacilo, na presença nelles de substancias que não são assimilaveis normalmente e que protejem o *substratum* vital do germen contra as substancias que o organismo deveria secretar, reajindo assim á infecção, destruindo o elemento invasor.

E' a camada cêrea, são os corpos de natureza graxa que existem no microbio da tuberculose que se opõem á destruição do bacilo; sua função protetora nos é cabalmente revelada pelos metodos de coloração especiais aos ácidos rezistentes; junte-se essa função que protege o bacilo a ganga de hidrocéluloze, os toxicos por elle fabricados e cuja natureza complexa tem sempre escapado ás investigações dos observadores, e veremos a razão da produção da célula gigante com todos os caracteristicos da lesão tuberculosa reveladas no tuberculo microscopico.

Encarada a essa luz, a infecção tuberculosa se nos apresenta como molestia local, como a afeção de um órgão. Nelle se devem passar as reações de defeza e isso nollo mostra não só a clinica, como a experimentação, revelando-nos, de todas as reações a mais facilmente apreciavel — a congestão peri-tubercular. E' este o primeiro estado do processo de necrose do tuberculo que terminará pela eliminação do tecido morto transformado em puz. A tuberculose mata pela destruição do tecido nobre do órgão; a terapeutica da tuberculose deve consistir na destruição do bacilo no interior da célula doente.

Entretanto a infecção tuberculosa é na maioria dos cazos espontaneamente paralizada e frequentes vezes curada, exclusivamente á custa do organismo infetado. E' banal:

question de la voie de l'inoculation a été aussi étudiée: Voie intraveineuse (Behring), voie intestinale (cas particulier de la voie lymphatique), (Calmette) ont donné des résultats prouvant toujours que la résorption du bacille ne se fait pas facilement et qu'on ne l'observe pas le plus souvent: les bacilles demeurent intacts, même inclus dans la cellule phagocytaire. C'est ce qui explique l'insuccès de la sérumthérapie. La raison de ce phénomène provient de la structure chimique du bacille, de la présence en lui de substances qui ne sont pas normalement assimilables et qui protègent le *substratum* vital du germe contre les substances que l'organisme devrait sécréter, de sorte qu'il réagit contre l'infection et que l'élément envahisseur est détruit.

C'est la couche cireuse, ce sont les corps gras du bacille de la tuberculose qui s'opposent à sa destruction; sa fonction protectrice nous est clairement révélée par les méthodes spéciales de coloration résistantes aux acides; ajoutez à cette fonction qui protège le bacille, les toxiques qu'il fabrique, la gangue d'hydrocellulose qui l'enveloppe et dont la nature complexe a toujours échappé aux investigations des observateurs, et nous comprendrons la raison de la production de la cellule géante, avec tous les signes caracteristiques de la lésion tuberculose révélés dans le tubercule microscopique.

Considérée à ce point de vue, l'infection tuberculeuse nous apparait comme une maladie locale, comme l'affection d'un organe. Celui-ci doit présenter des réactions de défense, qui nous sont d'ailleurs révélées par la chimie et l'expérimentation, grâce auxquelles nous observons la réaction la plus facile à observer: la congestion pérituberculaire.

C'est là le premier stage du procédé de la nécrose du tubercule, qui se terminera par l'élimination du tissu mort et sa transformation en pus. La tuberculose tue par la destruction du tissu noble de l'organe; la thérapeutique de la tuberculose doit consistir dans la destruction du bacille à l'intérieur de la cellule malade.

Toutefois, dans la plupart des cas, la tuberculose est paralysée spontanément et souvent même guérie, rien qu'aux dépens de l'organism-

frase a de todas as infeções é a tuberculose a mais curavel —, e as autopsias confirmam-na sempre. E' que o organismo reaje á infeção por dois processos de cura: pela escleroze do tuberculo ou pela calcificação delle. A evolução da lezão mostra comtudo que a escleroze precede sempre á calcificação. A analize dos tuberculos calcificados mostra que os sais de calcio, fosfato e a cal em natureza se depositam sobre o bacilo em camadas concentricas que o tem por nucleo, abundando no interior desses tuberculos cristais de natureza graxa.

Muitas vezes não se pode mais revelar a existencia de bacilos no interior dos tuberculos calcificados, sinal evidente de sua destruição. A ação esclerojena corre por conta dos toxicos bacilares (ação de tuberculina de Koch; produtos esclerojenos extraídos do bacilo, cloroformobacilina de Auclair), a reação calcificante corre por conta das substancias não reabsorvíveis do bacilo (cêras e gorduras) conforme pensamos.

Foi nesse sentido que dirijimos nossas investigações, de acôrdo com a orientação que nos foi fornecida por G. Cruz, nosso mestre.

Suas primeiras experiencias (1900) vizaram obter a reabsorção do bacilo, imunizando os animais por via subcutanea, primeiramente contra as gorduras animais (oleo de figado de bacalháo e gordura humana) mais tarde com as gorduras extraídas do bacilo. Verificou então que se essa reabsorção se dava, era de tal modo lenta que, praticamente, podia ser considerada como não existindo.

De acôrdo com essa verificação poderíamos tentar a reabsorção dos bacilos com o fim de imunização, utilizando-nos da via intestinal, segundo a doutrina de Calmette, resultado que seria obtido com a saponificação desses corpos pelos sucos pancreaticos, especialmente pela esteapsina, como mostraram Lewkowitsch e Macleod, pelos sais biliares, e talvez ainda pela lipaze do sangue, como se dá com a monobutirina, como resulta das investigações de Victor Hanriot. Isso entretanto não sucede porque as gor-

me infecté. «De toutes les infections, la plus facilement guérissable est la tuberculose». C'est, la phrase bien connue, et toujours confirmée par les autopsies. C'est que l'organisme réagit de deux manières contre l'infection: par la sclérose du tubercule ou par sa calcification. L'évolution de la lésion montre, cependant, que la sclérose précède toujours la calcification.

L'analyse des tubercules calcifiés nous prouve que le phosphate de chaux et la chaux en nature se déposent sur le bacille en couches concentriques dont il constitue le noyau; l'intérieur de ces tubercules abonde en cristaux de nature grasseuse.

Souvent on ne peut plus vérifier l'existence de bacilles à l'intérieur des tubercules calcifiés, preuve évidente de leur destruction. L'action sclerogène est attribuée aux toxiques bacillaires (action de la tuberculine de Koch; produits sclérogènes extraits du bacille: chloroformobacilline d'Auclair). La réaction calcifiante est produite, selon nous, par les substances du bacille qui ne se peuvent résorber (cires et graisses). C'est dans ce sens que nous avons dirigé nos recherches, en suivant l'orientation qui nous a été fournie par notre maître G. Cruz.

Dans ses premières expériences, réalisées en 1900, il avait cherché à obtenir la résorption du bacille en injectant les animaux par voie sous-cutané, d'abord avec des graisses animales (huile de foie demorue et graisse humaine) plus tard au moyen des graisses extraites du bacille. Il vérifia alors que cette résorption s'effectuait avec une telle lenteur qu'elle pouvait être considérée pratiquement nulle.

Nous pourrions, en vue de cette vérification, tenter la résorption des bacilles, dans un but d'immunisation, en nous servant de la voie intestinale, selon la doctrine de Calmette, résultat qu'on obtiendrait par la saponification de ces corps par les sucs pancréatiques, en particulier par la stéapsine comme l'ont montré Lewkowitsh et Macleod, par les sels biliaires et peut-être encore par la lipase du sang, comme il arrive avec la monobutyryne, comme on le déduit des investigations de V. Hanriot. Cela n'arrive pourtant pas, parce que les graisses ont leurs ferments spécifiques (Fischer, Pawlow).

duras tem seus fermentos específicos (Fischer, Pawlow).

De acôrdo com essa orientação impunha-se o conhecimento exato da natureza quimica das substancias gordurozas existentes no bacilo da tuberculose e que de ha muito serviam para explicar o fenomeno da acido-rezistencia que era atribuido unicamente a ellas.

Hammerschlag, no emtanto, já em 1889 reconhecera que no bacilo da tuberculose existe substancia de natureza albuminoide que possue a propriedade de rezistir aos acidos, quando corada. Modernamente, Auclair e Paris provaram que a acido-rezistencia é fenomeno complexo dependente da acido-rezistencia parcial de diversos componentes do corpo do bacilo.

Com o objetivo de reconhecermos a natureza dessas gorduras procedemos em um aparelho de Soxhlet ao esgotamento de bacilos da tuberculose esterilizados pelo calôr e secos, tratando-os, sucessivamente, pelos seguintes dissolventes das gorduras: xilol, alcool a 95°, eter e cloroformio. Os bacilos colocados entre duas camadas de algodão de vidro eram sujeitos á ação dos dissolventes, na ordem acima indicada até que se não obtivesse reziduo pela evaporação de 10cc do dissolvente empregado e que era colhido acima do algodão de vidro, e até o ensaio de Lightfoot (ensaio de canfora) mostrar-se negativo. Os produtos obtidos apoz o esgotamento eram filtrados em véla de porcelana e os reziduos bacilares examinados ao microscopio. Esses reziduos bacilares permanecem acido-rezistentes até final tratamento pelo cloroformio; o aspeto, porém, dos bacilos modifica-se, apresentando-se elles mais finos e mais granulozos, como se tivera havido perda de substancias existentes no corpo microbiano intermediarios d'aquellas granulações.

Dos produtos extraidos pelo xilol, um é precipitavel pelo alcool absoluto em excesso. Apresenta-se sob o aspeto de substancia pulverulenta, branco-amarelada.

Esse precipitado colhido sobre um filtro

Nous avons donc à rechercher quelle était exactement la nature chimique des substances grasiseuses contenues dans le bacille de la tuberculose, lesquelles servaient depuis longtemps à expliquer le phénomène de la résistance aux acides qui leur était exclusivement attribuée.

Cependant, en 1889, Hammerschlag avait déjà vérifié qu'il existe dans le bacille de la tuberculose une substance de nature albuminoide qui possède la propriété de résister aux acides, quand elle est colorée. De nos jours, Auclair et Paris ont prouvé que la résistance aux acides est un phénomène complexe, qui dépend de la résistance partielle aux acides de plusieurs composants du corps du bacille.

Dans le but de reconnaître la nature de ces graisses, nous avons égoutté dans un appareil de Soxhlet les bacilles de la tuberculose stérilisés par la chaleur et secs, en les traitant successivement par les dissolvants qui suivent: xylol, alcool à 95°, éther et chloroforme. Les bacilles placés entre deux couches d'ouate de verre étaient soumis à l'action des dissolvants, dans l'ordre ci-dessus mentionné, jusqu'à ce qu'on n'obtins plus de résidu par l'évaporation de 10 cc. du dissolvant employé et qui était recueilli sur l'ouate de verre, et que l'essai de Lightfoot (essai du camphre) donnât un résultat négatif. Les produits obtenus après l'égouttement étaient filtrés à travers une bougie de porcelaine et les résidus bacillaires examinés au microscope. Ces résidus se conservent résistants aux acides jusqu'au traitement final par le chloroforme; mais l'aspect des bacilles se modifie, ils deviennent plus minces et plus granuleux, comme s'il y avait eu une perte dans le corps microbien de substances intermédiaires entre ces granulations.

L'un des produits extraits par le xylol donne un précipité, avec l'alcool en excès. Ce précipité a l'aspect d'une substance pulverulente, d'un blanc jaunâtre; une fois recueilli sur un filtre et traité par l'éther, il se dissout en partie; il reste sur le filtre un résidu insoluble dans le chloroforme.

Si l'on examine au microscope le précipité obtenu de la façon ci-dessus décrite, il appa-

e tratado pelo eter dissolve-se em parte; sobre o filtro permanece um reziduo insolvel no eter e soluvel no cloroformio.

O precipitado obtido como acima dissemos, examinado ao microscopio apresenta-se como constituido por pequenos granulos refrinjentes (Obj. C e E, Zeiss Oc. 3). Córase pelo Ziehl e reziste aos acidos. E' insolvel na agua destilada, agua alcalinizada e alcool, quer a frio, quer nos respetivos pontos de ebullição. Decompõe-se pelo tratamento com o acido azotico ao terço, fervente, dando produção de gorduras reconheciveis pelo *Sudão*.

A saponificação dessa substancia pela soda alcoolica mostrou tratar-se de uma cêra em cuja constituição entra um alcool izomero da colessterina, porém diferente da izocolessterina e fitosterina.

A separação da porção soluvel no eter da que é soluvel no cloroformio mostra, pela evaporação dos referidos veiculos dois produtos de aspeto diverso: branco-amarelado a porção soluvel no eter, mais escura a porção soluvel no cloroformio. A primeira é uma cêra, a segunda não pode ainda ser caraterizada, dada a pequena quantidade obtida. Esses dois produtos diferem ainda pelo ponto de fuzão. A cêra soluvel no eter funde a 54,5 C, o produto soluvel no cloroformio tem para ponto de fuzão 193° C.

O xilol de onde fôra precipitada a cêra pelo alcool absoluto, libertado desse alcool e tratado pela agua, deixa precipitar uma substancia soluvel no eter. Pela evaporação desse dissolvente, cristaliza em tufos de agulhas sedozas. E' saponificavel pela soda alcoolizada e sendo fundida em estado cristallino apresenta-se, apoz a fuzão, sob o aspeto de massas escamozas, nacaradas. A cristalização indica acido palmitico. Si em vez de tratarmos pela agua evaporarmos o xilol em B. M. obter-se-á um produto, que, pelo resfriamento se solidifica com aspeto gordurozo, de côr amarela avermelhada. Tem o cheiro de tuberculina um pouco alterado aproximando-se do cheiro de mel de abelhas e

rait comme constitué par de petits granules réfringents (Obj. C e E, Zeiss oc. 3). Il se colore sous l'action du Ziehl, résiste aux acides et reste insoluble dans l'eau distillée, l'eau alcoolisée et l'alcool, soit à froid, soit à leur point d'ébullition. Il se décompose sous l'action de l'acide azotique au tiers, bouillant, et produit alors des graisses reconnaissables par le *Soudan*.

La saponification de cette substance par la soude alcoolique a montré qu'il s'agissait d'une cire dans la constitution de laquelle il y a un alcool isomérique de la cholestérine différent, toutefois, de l'isocholestérine et de la phytostérine.

La séparation de la partie soluble dans l'éther d'avec celle qui est soluble dans le chloroforme nous montre, par l'évaporation des véhicules deux produits d'aspect différent: la partie soluble dans l'éther laisse un résidu blanc jaunâtre; le résidu de l'autre partie est plus foncé. La premier est une cire; quant au second, la quantité obtenue est si petite qu'on n'a encore pu la déterminer. Ces deux produits diffèrent encore par leur point de fusion. La cire soluble dans l'éther fond à 54,05 C.; le point de fusion du produit soluble dans le chloroforme est 193° C.

Le xylol, d'où la cire a été précipitée par l'alcool absolu, une fois délivré de cet alcool et traité par l'eau, laisse précipiter une substance soluble dans l'éther. Par l'évaporation de ce dissolvant, elle cristallise en touffes d'aiguilles soyeuses et peut être saponifiée par la soude alcoolique; une fois fondu à l'état cristallin, elle se présente, après la fusion, sous l'aspect de masses écaillées et nacrées. Sa cristallisation indique un acide palmitique. Si, au lieu de le traiter par l'eau, on fait évaporer le xylol en B. M. on obtient un produit qui, en se refroidissant, se solidifie et prend l'aspect d'un corps gras, d'un jaune rougeâtre. Il a une odeur de tuberculine un peu altérée, qui rappelle le parfum du miel et a une saveur âcre très prononcée. Il fond à 53,05, se solidifie à 52° C. et est soluble dans les dissolvants des graisses. L'épreuve de Lightfoot donne un résultat positif, et ne révèle pas la présence de graisses dans les autres dissol-

sabôr acre muito pronunciado. Funde a 53°5, e solidifica-se a 52° C; é solúvel nos dissolventes das gorduras. O ensaio de Lightfoot dá resultado positivo. Esse mesmo ensaio não revela gorduras nos outros dissolventes empregados (alcool, eter e cloroformio). O cloroformio extrae dos bacilos uma lecitina precipitável pela agua.

Retomando os bacilos desengordurados e córando-os pelo metodo de Ziehl verificamos que permanecem acido-rezistentes o que está de acôrdo com o que tinha sido observado por Auclair e Paris. Isto nos levou a investigar um metodo de coloração diferencial entre os bacilos da tuberculose e os pseudo-tuberculosos. Entre estes a acido-rezistencia é tambem relativa e varia, desde o tempo de cultura, até a origem do bacilo estudado. A dificuldade consistia, pois, em encontramos um agente descorante capaz de produzir os seus efeitos sobre os para-tuberculosos, poupando o bacilo da tuberculose verdadeira. Outro caminho seria acharmos uma materia corante eletiva que os diferenciassse nitidamente.

Si apoz a ação descorante da mistura de alcool absoluto 1 parte e acido acetico 2 partes fizermos o Gram sobre o preparado, os bacilos paratuberculosos tomarão intensamente a côr bazica, apresentando volumozas granulações condensadas. Os bacilos da tuberculose se comportam de maneira diversa; conservar-se-ão corados em vermelho e, as granulações intensamente coradas pelo violeta de genciana, apresentar-se-ão esparsas. Córando um preparado de tuberculose e de pseudo-tuberculose pelo Ziehl e descorando-o rapidamente por uma solução acida (acido azotico ao terço, acido sulfurico ao quarto) si o tratarmos por uma solução aquozza de azul de metilenio e si fizermos sobre esta ajir uma solução de acido picrico, o azul precipitará sob forma cristalina.

Esses cristais são soluveis na agua, pouco soluveis no alcool etilico e bastante soluveis no alcool metilico. Si examinarmos então o preparado veremos que os bacilos se-apresentam mais descorados em relação

vants employés (alcool, éther et chloroforme). Le chloroforme extrait des bacilles une lécitine qui donne avec l'eau un précipité.

En reprenant les bacilles privés maintenant de graisse et en les colorant par la méthode de Ziehl, nous vérifions qu'ils se conservent résistants aux acides, ce qui est d'accord avec les observations d'Auclair et Paris. Cela nous a conduits à chercher une méthode de coloration différentielle entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux. Parmi ceux-ci, la résistance aux acides est aussi relative et varie dès le temps de culture jusqu'à l'échantillon du bacille étudié. La difficulté consiste donc à trouver un agent décolorant capable de produire son effet sur les paratuberculeux, tout en épargnant le bacille de la vraie tuberculose. Nous pourrions aussi tâcher de trouver une matière colorante élective qui les différencie nettement.

Si, après l'action décolorante du mélange de 1 partie d'alcool absolu et 2 parties d'acide acétique sur une préparation colorée par le Ziehl nous faisons le Gram, les bacilles paratuberculeux prendront entièrement la couleur violette, en présentant de volumineuses granulations condensées. Les bacilles de la tuberculose se comportent d'une façon différente. Ils conservent la couleur rouge, et les granulations fortement colorées par le violet de gentiane, apparaîtront disséminées. En colorant une préparation de tuberculose et de pseudo-tuberculose par le Ziehl et en la décolorant rapidement par une solution acide (acide azotique au tiers, acide sulfurique au quart) et si nous la traitons par une solution aqueuse de bleu de méthylène dans laquelle verse une solution d'acide picrique, le bleu se déposera sous la forme cristalline. Ces cristaux sont insolubles dans l'eau, peu solubles dans l'alcool éthylique et assez solubles dans l'alcool méthylique. Si nous examinons alors la préparation, nous verrons que les bacilles se présentent plus décolorés, par rapport au Ziehl, qu'avant l'action de l'acide picrique et que, parmi les pseudo-tuberculeux, quelques uns apparaissent colorés en violet. On comprend que l'acide picrique ait provoqué une décoloration plus énergique, non

ao Ziehl que antes da ação do ácido picrico e que os pseudo-tuberculosos se apresentam alguns corados em violeta. Compreende-se que o ácido picrico tenha determinado esse descoramento mais energético, não só por sua função de ácido, como por deslocar o Cl da molécula do azul de metilénio.

Restava investigar si o picrato de azul de metilénio precipitado possuía propriedade de coloração eletiva para os pseudo-tuberculosos.

A mistura da solução de Ziehl e emulsão concentrada em glicerina e água do picrato de azul de metilénio, apresenta a particularidade interessante de corar a quente em vermelho, especificamente, os ácido-resistentes (tuberculose ou pseudo-tuberculose) ao passo que o núcleo das células do material examinado e os outros bacterios que ali possam existir (caso particular do escarro) coram-se em violeta. O protoplasma das células conserva-se roxo. A diferenciação faz-se pelo álcool-acetona.

O tratamento pelo Lugol, após a ação da mistura acima referida, parece modificar as condições de coloração do preparado. Conseguimos, assim, o descoramento completo de algumas amostras de pseudo-tuberculose após a ação do Lugol e álcool-acetona. Nessas condições a tuberculose conserva-se vermelha com granulações violetas, todo o resto da preparação descora-se dando lugar a que se proceda à coloração do fundo por qualquer cor de contraste.

Melhor resultado observámos, porém, usando em vez do picrato de azul de metilénio, o cristal violeta ou a violeta de gentiana fenicados. Essas cores apresentam um grau maior de eletividade para as granulações dos bacilos.

Esse método nos deu magníficos resultados, trazendo real vantagem no diagnóstico diferencial. O álcool-acetona, que é o descorante empregado, mostra-se capaz de libertar os pseudo-tuberculosos da fucsina, ao passo que os tuberculosos verdadeiros a conservam, apresentando-se corados em vermelho. As granulações coradas em violeta contrastam

seulement parcequ'il agit comme acide mais aussi il sépare le Cl de la molécule du bleu de méthylène.

Il restait à voir si le picrate du bleu de méthylène, une fois précipité, possédait la propriété de coloration élective vis à vis des pseudo-tuberculeux.

Le mélange de la solution de Ziehl avec l'émulsion concentrée du picrate de bleu de méthylène en glycérine et eau présente l'intéressante particularité de colorer en rouge, à chaud, spécifiquement, les bacilles résistants aux acides (tuberculose ou pseudo-tuberculose) tandis que le noyau des cellules du matériel examiné et les autres bactéries qui peuvent par hasard s'y trouver (cas particulier du crachat) se colorent en violet. Le protoplasme des cellules conserve une teinte rosée. La différentiation s'établit par l'alcool-acétone.

Le traitement par le Lugol, après l'action du mélange dont nous venons de parler, semble modifier les conditions de coloration de la préparation. Nous avons obtenu ainsi la décoloration complète de quelques échantillons de pseudo-tuberculose sous l'action du Lugol et de l'alcool-acétone. Dans ces conditions, la tuberculose reste rouge, avec des granulations violettes; tout le reste de la préparation se décolore, en permettant la coloration du fond, par une couleur quelconque.

Nous avons obtenu un meilleur résultat en employant au lieu du picrate de bleu de méthylène le cristal violet ou le violet de gentiane phéniqués. Ces couleurs ont une plus grande force d'électivité pour les granulations des bacilles.

Cette méthode nous a donné des très beaux résultats, en produisant un réel avantage dans le diagnostic différentiel. L'alcool acétone, qui est le décolorant employé, est capable de faire disparaître la fuchsine des pseudo-tuberculeux, tandis que les vrais tuberculeux la conservent, et présentant une couleur rouge. Les granulations colorées en violet ressortent admirablement à l'intérieur des bacilles. Le bleu de méthylène est très bon pour la coloration du fond.

En un mot, nous proposons la méthode suivante comme la meilleure pour la différen-

admiravelmente no interior dos bacilos. O azul de metileno presta-se muito bem para a coloração do fundo.

Propomos, em resumo, como metodo de escolha na diferenciação microscopica entre os bacilos da tuberculose e os pseudo-tuberculosos, o seguinte:

- A) Córar a quente pela fucsina fenicada de Ziehl, cerca de 2 minutos.
Lavar em agua corrente.
- B) Córar pelo cristal violeta fenicado, durante 2 minutos.
- C) Tratar pelo Lugol.
- D) Descorar pela mistura:
Alcool absoluto 2 partes.
Acetona 1 parte.
Lavar — Córar por uma côr de contraste (azul de metileno em solução aquosa).

As soluções uzadas em A e B podem ser empregadas em um só tempo, sendo misturadas em partes iguais. As preparações assim feitas são, no entretanto, menos nítidas.

Os bacilos da tuberculose apresentam-se *córados em vermelho*, mostrando em seu interior *granulações esparsas*, intensamente coradas em violeta.

Os paratuberculosos apresentam-se *córados em violeta sem orla vermelha*, mostrando *granulações condensadas*.

Os microbios de associação (escarro, puz, etc.): pneumococos, stafilococos, streptococos, etc. tomarão o Gram e os outros serão revelados pela côr de contraste (azul de metileno). O mesmo sucederá aos elementos constituintes do material examinado.

Acabamos de ver que, si tratarmos o bacilo da tuberculose em condições adequadas pelo metodo de Gram suas granulações apresentam a propriedade de reter energicamente a materia córante. Si em preparados córados a quente pelo Ziehl e assim fortemente impregnados empregarmos o Gram, mesmo sem lavagem da lamina para a retirada do excesso de fucsina, as granulações apresentar-se-ão intensamente córadas em vio-

lucinação microscopica entre les bacilles de la tuberculose et les pseudo-tuberculeux:

- A) Colorer à chaud par la fuchsine phéniquée de Ziehl, deux minutes environ.
Laver dans l'eau courante.
- B) Colorer par le cristal violet phéniqué, pendant 2 minutes.
- C) Traiter par le Lugol.
- D) Décolorer par:
Alcool absolu 2 parties.
Acétone 1 partie.
Laver — Colorer avec une couleur de contraste (bleu de méthylène en solution aqueuse).

Les solutions dont on se sert pour A et B peuvent être employées en même temps, mélangées, en parties égales; mais les préparations sont, en ce cas, moins nettes.

Les bacilles de la tuberculose auront une *coloration rouge*, avec, à l'intérieur, des granulations fortement colorées en violet.

Les para-tuberculeux apparaissent *colorés en violet*, et montrent des granulations condensées.

Les microbes d'association (crachat, pus, etc.): pneumocoques, staphylocoques, streptocoques etc. prendront le Gram et les autres seront révélés par la couleur de contraste (bleu de méthylène). Il en sera de même pour les éléments constitutifs du matériel examiné.

Nous venons de voir que si nous traitons le bacille de la tuberculose dans des conditions adéquates, par la méthode de Gram, ses granulations présentent la propriété de retenir énergiquement la matière colorante. Si, dans des préparations colorées à chaud par le Ziehl et, par suite, fortement teintées, nous employons le Gram, même sans laver, pour retirer l'excès de fuchsine, les granulations apparaîtront entièrement colorées en violet. Il en sera de même si cette coloration est faite en sens inverse: les granulations se colorent en violet et le reste du bacille en rouge. Cette seconde méthode ne donne cependant pas des préparations aussi nettes que la première. Il en sera de même si nous faisons le mélange des matières colorantes sur la lame, colorée à chaud, après l'action du Lugol si nous faisons la décoloration par l'alcool absolu ou l'alcool acétone.

leta. O mesmo sucederá si essa coloração fôr feita em sentido inverso: as granulações córam-se em violeta e o resto do bacilo em vermelho. Esse segundo modo de proceder não dá, comtudo, preparações tão nitidas quanto o primeiro. O mesmo sucederá ainda, si fizermos a mistura das materias corantes e sobre a lamina córada a quente, apoz a ação do Lugol descorarmo-la pelo alcool absoluto ou alcool acetona.

Por outro lado, si em preparações córadas pelo Ziehl fizermos agir rapidamente o cristal violeta, nem todas as granulações tomam a materia corante; vêm-se, então, no corpo do bacilo, intensamente córado em vermelho, pontos refrinjentes, brilhantes, que representam as granulações não córadas. Infere-se disso que essas granulações tem maior eletividade para a materia corante do metodo de Gram do que para a fucsina e que não se trata de uma superposição de côres e sim de uma propriedade eletiva.

Um outro argumento rezulta da observação de espaços menos córados nos bacilos coloridos só pelo Ziehl e que antigamente eram considerados diversamente como esporios ou como vacuolos.

Nas culturas homojeneas de tuberculose onde a biologia do bacilo é fortemente modificada, em virtude de adaptação forçada a essa nova condição de vida, as granulações prestam-se muito para estudo, especialmente nas formas ramozas ou actinomicozas.

Aprezentam-se aí como granulos (oc. comp. 12, Zeiss) incluídos em um espaço bem limitado, de contornos nitidos. A's vezes fazem saliencia no limite externo do bacilo, como se devessem em breve ser expulsos, o corpo do bacilo apresenta-se mais grosso e a substancia que se córa em vermelho e que envolve diretamente o granulo mostra-se mais delgada; entre elle e o corpo bacilar nota-se pequena orla clara.

O numero dessas granulações varia de 1 a 6 em cada bacilo; raras vezes atinge a 8 ou a 10, o que sómente observamos em culturas homojeneas de mais de mez. Quando unica, apresenta-se geralmente no centro do

D'un autre côte si nous faisons agir rapidement le cristal violet sur des préparations colorées par le Ziehl, toutes les granulations ne souffrent pas l'effet de la matière colorante; on voit alors dans le corps du bacille entièrement coloré en rouge, des points réfringents, brillants, qui sont les granulations non colorées. On en déduit que ces granulations ont une plus grande électivité pour la matière colorante de la méthode de Gram que pour la fuchsine et qu'il ne s'agit pas d'une superposition de couleurs, mais bien d'une propriété élective.

On tire un nouvel argument de l'observation des parties moins colorées chez les bacilles colorés uniquement par le Ziehl et qui étaient autrefois considérées, soit comme des spores, soit comme des vacuoles.

Dans les cultures homogènes de tuberculose, où la biologie du bacille est profondément modifiée, en vertu de son adaptation forcée à cette nouvelle condition d'existence, les granulations servent bien mieux à l'étude, surtout s'il s'agit des formes ramifiées ou actinomycosiques.

Elles se présentent, alors, comme des granulations (oc. comp. 12, Zeiss) occupant un espace bien délimité, aux contours nets. Elles forment parfois saillie dans le corps du bacille, comme si elles devaient bientôt en être expulsées; le corps du bacille est plus gros, et la substance qui se colore en rouge et entoure directement le granule, plus mince; on peut voir un petit ourlet clair entre elle et le corps du bacille.

Le nombre de ces granulations varie de 1 à 6 par bacille; il n'atteint que rarement 8 ou 10, ce qu'on n'observe, d'ailleurs, que dans les cultures homogènes de plus d'un mois. Lorsqu'elle est unique elle apparait, généralement, au centre du bacille ou à l'un de ses pôles; quand il y en a deux, chacune occupe, en général, l'une des extrémités du bacille; dans les autres cas, elles se disposent en série, rectiligne ou infléchie, selon le plan d'orientation du bacille.

Dans les formes bacillaires désagrégées — comme on l'observe aussi dans des cultures anciennes — les granulations se présentent

bacilo ou em um dos seus pólos; quando duas ocupa geralmente cada uma, um dos pólos do bacilo; nos outros casos dispõem-se em serie retilinea ou incurvada, seguindo o plano de orientação do bacilo.

Nas formas bacilares dezagregadas, como succede observar-se em culturas antigas, as granulações apresentam-se, ás vezes, dispostas umas em seguimento ás outras, como streptococos, outras vezes esparsas, izoladas.

Nas culturas recentes em batata, na tuberculose virulenta, modifica-se o aspeto dessas granulações que se mostram muitissimo menores. O mesmo se observa, fazendo-se seu estudo comparativo nos escarros de individuos não cavernozos e no dos tuberculosos antigos, cavitarios.

Essa diferença é mais sensivel nos escarros de tuberculosos sujeitos ao tratamento pela tuberculina, por muito tempo. Nestes ultimos chega-se mesmo a não se encontrar mais bacilos revelaveis pelo Ziehl, ao passo que as granulações raramente faltam e a inoculação na cobaia revela a existencia de tuberculose.

O mesmo succede no pus tuberculoso, como no caso dos abcessos frios e a forma granular recentemente descrita por Muchs encontra nisso a sua explicação. Daí o inferir-se ser a forma granular, senão forma de rezistencia caracteristica, pelo menos a forma de maior rezistencia que o bacilo da tuberculose possa tomar.

A auzencia de bacilos da tuberculose caracterizaveis pelo Ziehl no pus dos abcessos tuberculosos; a existencia no pus tuberculoso de granulações e de bacilos revelaveis pelo metodo de Gram e a eletividade das granulações do bacilo para esse metodo de coloração, foram razões que determinaram verificassemos si nos ganglios tuberculosos havia formação de uma substancia capaz de modificar a estrutura do bacilo da tuberculose ou mesmo de destruil-o.

Com esse intuito procedemos *in vitro* ás seguintes experiencias: Ganglios caseozos de cobaias tuberculizadas com tuberculose humana foram triturados e macerados em agua

parfois les unes à la suite des autres, comme des streptococos; elles sont parfois isolées, disséminées.

Dans les cultures récentes en pomme de terre, dans la tuberculose virulente, l'aspect de ces granulations est modifié; elles sont alors beaucoup plus petites. On peut faire les mêmes observations en les comparant dans les crachats d'individus non caverneux et dans ceux de tuberculeux anciens, cavitaires.

Cette différence est plus sensible dans les crachats des tuberculeux soumis pendant longtemps au traitement par la tuberculine. On arrive même, chez ces derniers, à ne plus trouver de bacilles qui puissent être révélés par le Ziehl, tandis que les granulations ne font que rarement défaut et que l'inoculation révélée, chez les cobayes, l'existence de la tuberculose.

On observe les mêmes phénomènes dans le pus tuberculeux, ainsi que dans le cas des abcès froids, et c'est là que la forme granulaire décrite dernièrement par Muchs trouve son explication.

D'où l'on a déduit que la forme granulaire est, sinon la forme de résistance caractéristique, tout au moins la forme la plus résistante que puisse prendre le bacille de la tuberculose.

L'absence de bacilles de la tuberculose déterminables par le Ziehl dans le pus des abcès tuberculeux; l'existence dans ce pus tuberculeux des granulations et de bacilles que nous révèle la méthode de Gram, et l'électivité des granulations du bacille pour cette méthode de coloration, telles sont les raisons qui nous ont poussés à vérifier s'il se formait dans les ganglions tuberculeux une substance capable de modifier la structure du bacille de la tuberculose ou même de le détruire.

Dans ce but, nous avons procédé *in vitro* aux expériences suivantes: Des ganglions caséux de cobayes tuberculisés avec de la tuberculose humaine ont été triturés et mis en macération dans de l'eau physiologique glycerinée à 10% et phéniquée à 0,5%. Cette émulsion a été divisée en deux parties qui sont restées dans l'étuve à 38° c., l'une pendant 48 heures et l'autre pendant 72.

Au bout de ce temps, les émulsions ont

fisiologica glicerizada a 10% e fenicada a 0,5%. Essa emulsão foi dividida em duas porções que permaneceram na estufa a 38°C uma, durante 48 horas e outra durante 72 horas.

Findos esses prazos foram as emulsões filtradas em algodão e o filtrado usado então em nossos ensaios.

Como testemunhas empregamos ganglios de cobaias infetadas com tripanozomas, que provocam forte reação ganglionar, e como consequencia, adenopatias volumozas. Essas cobaias eram consideradas normais em relação ás infetadas com tuberculose. Esses ganglios eram igualmente triturados e emulsionados em agua fisiologica glicerizada e fenicada e postos a macerar em condições identicas aos ganglios tuberculosos.

Por outro lado, nos utilizavamos de emulsão de bacilos de tuberculose feita em veiculo identico ao empregado para os extratos ganglionares, para servir de testemunha ao extrato de ganglios normais.

Eram as emulsões ganglionares postas em contato com os bacilos tuberculosos, obedecendo á tecnica abaixo descrita.

As contagens foram feitas com oc. 12 Zeiss em laminas coradas pelo metodo que proponho neste trabalho, usando no entretanto como descolorante sómente o alcool absoluto.

As preparações das emulsões bacilares que continham extrato de ganglios tuberculosos eram feitas em uma extremidade da lamina; a outra extremidade era ocupada pela preparação da emulsão que continha o extrato de ganglio normal. Assim ficavam as preparações testemunhas em condições identicas de experimentação.

Para maior facilidade adotamos a seguinte notação no correr da experimentação:

- e. g. t. = extrato de ganglios tuberculosos.
- e. g. n. = extrato de ganglios normais.
- e. b. t. = emulsão de bacilos da tuberculose.
- v. = veiculo (agua fisiologica glicerizada a 10% e fenicada a 0,5%).

été filtrées à travers de l'ouate et le résidu employé dans nos expériences.

Nous nous sommes servi, comme témoins de ganglions de cobayes infectés par des trypanosomes qui provoquent une forte réaction ganglionnaire et, en conséquence, de volumineuses adénopathies. Ces cobayes étaient considérés normaux par rapport aux cobayes infectés par la tuberculose. Ces ganglions étaient également triturés et émulsionnés dans de l'eau physiologique, glycerinée et phéniquée, et la macération était faite dans des conditions identiques à celles des ganglions tuberculeux.

D'un autre côté, nous nous sommes servis d'une émulsion de bacilles de la tuberculose faite dans les mêmes véhicules employés pour les extraits ganglionnaires, pour servir de témoin à l'extrait des ganglions normaux.

Les émulsions ganglionnaires étaient mises en contact avec les bacilles tuberculeux, d'après le procédé que nous avons décrit.

Les comptages ont été faits avec l'oc. 12 Zeiss sur des lames colorées par la méthode proposée ci-dessus, mais en n'employant comme décolorant que l'alcool absolu.

Les préparations des émulsions bacillaires qui contenaient de l'extrait des ganglions tuberculeux étaient faites sur l'extrémité d'une lame; à l'autre extrémité se trouvait la préparation de l'émulsion qui contenait l'extrait du ganglion normal. Les préparations témoins se sont ainsi trouvées dans des conditions identiques d'expérimentation.

Pour simplifier la chose, nous avons adopté la notation suivante au cours de l'expérimentation:

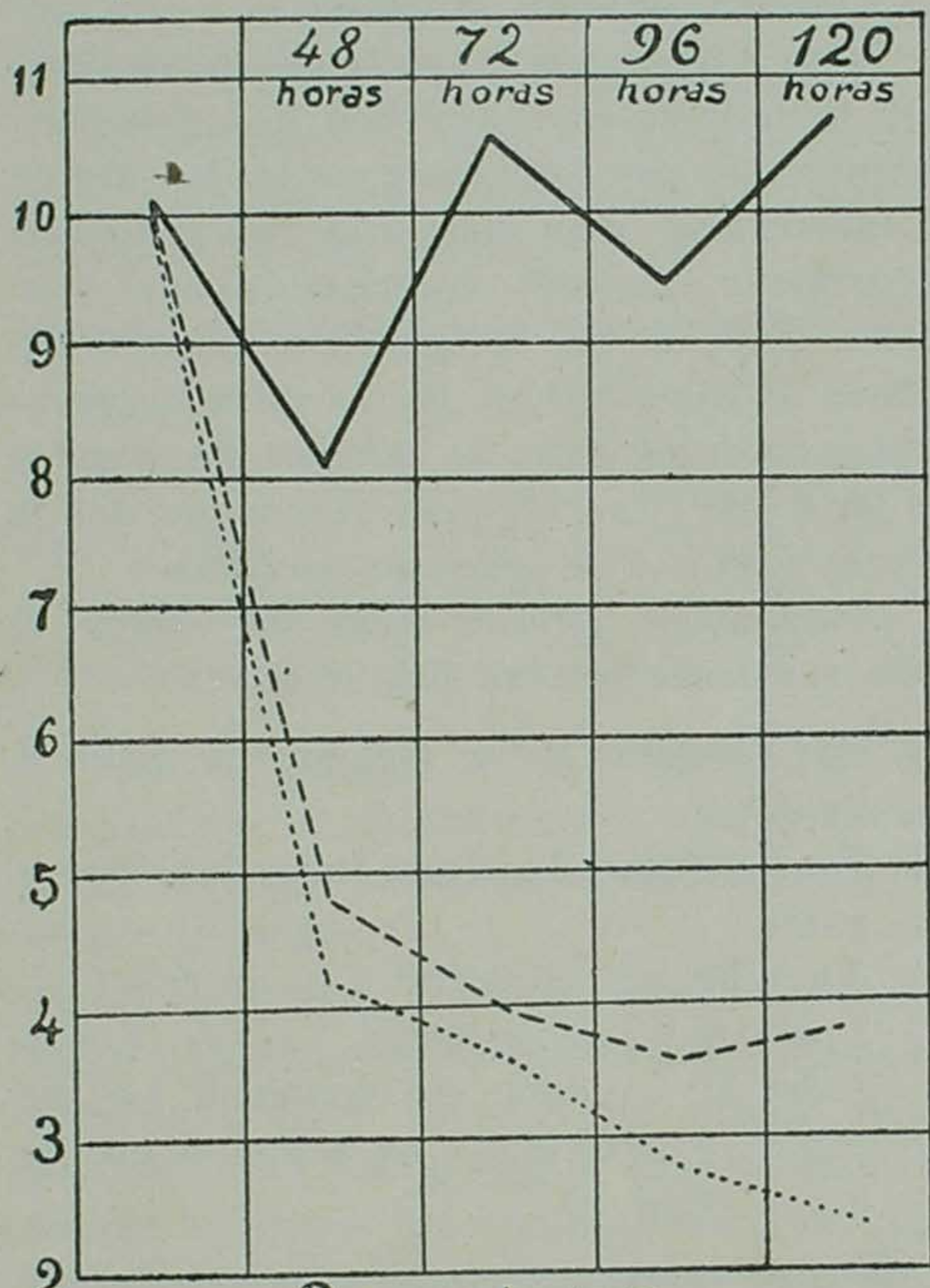
- e. g. t. = extrait de ganglions tuberculeux.
- e. g. n. = » » » normaux.
- e. b. t. = émulsion de bacilles de la tuberculose.
- v. = véhicule (eau physiologique glycerinée à 10% et phéniquée à 0,5%).

Nous avons employé la technique suivante: Les extraits ganglionnaires étaient mélangés avec une émulsion de bacilles de tuberculose humaine faite dans de l'eau physiologique glycerinée à 10% et phéniquée à 0,5% dans les proportions suivantes:

Uzamos da seguinte tecnica: Os extratos ganglionares eram misturados a uma emulsão de bacilos de tuberculose humana feita em agua fisiologica, glicerinada a 10% e fenicada a 0,5%, na seguinte proporção:

N. de bacilos por campo microscopico

Experiencia I



Porcentagem.

-----	41,0%	62,2%	61,4%	64,8%
.....	48,2%	60,5%	69,6%	78,7%

- 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
- 1 cc e. b. t. + 0,5 cc e. g. t. + 0,5" V
- 1 cc e. b. t. + 1 cc V.

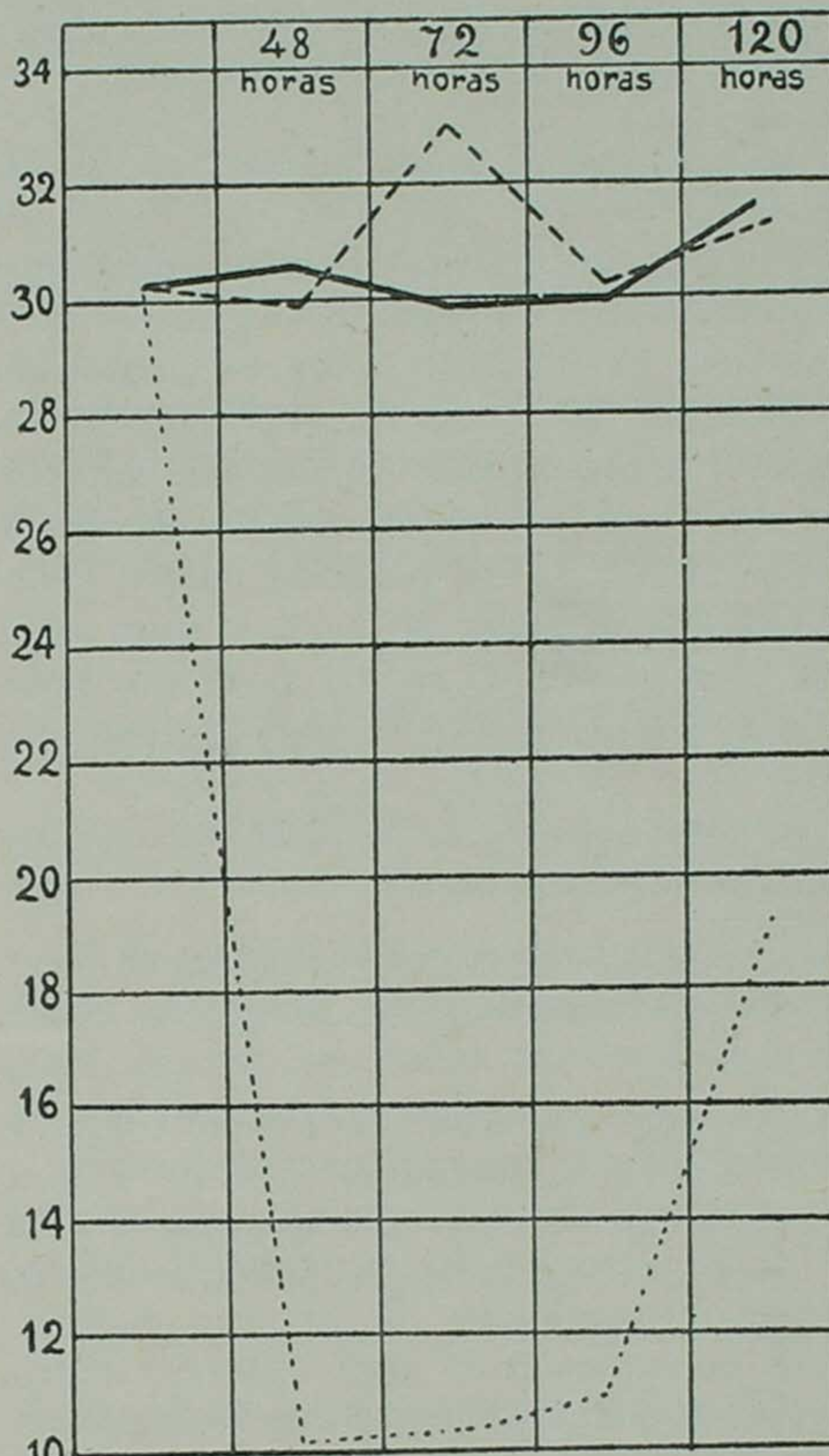
Experiencia I

- 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
- 1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
- 1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Essas misturas, colocadas em tubos arrolhados com rolhas de borracha permaneciam na estufa a 38° c., sendo agitadas diariamente e no momento de se fazerem as preparações para as contagens.

N. de bacilos por campo microscopico

Experiencia II



Porcentagem

	66,3%	65,5%	63,6%	41,0%
--	-------	-------	-------	-------

- 1 cc e. b. t. + 1 cc V.
- 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. u.
- 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.

Expérience I

- 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
- 1 cc e. b. t. + 5 cc e. g. t. + 5 cc v.
- 1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

Ces mélanges étaient placés dans des tubes recouverts d'un bouchon en caoutchouc et restaient dans une étuve à 38° C. On les agitait tous les jours et au moment de faire les préparations pour les comptages.

Experiencia II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (testemunha).
 1 cc e. b. t. + 1 cc v. (testemunha).

Procedeu-se de modo identico ao da Experiencia I.

Pelo exame desses resultados vemos que o produto da extração dos ganglios normais não exerce ação sobre os bacilos da tuberculose; por outro lado, os ganglios tuberculosos caseificados contêm uma substancia cuja ação se exerce até 120 horas de contato (Exp. I). O pequeno aumento observado no numero de bacilos entre 96 a 120 horas depois (Exp. II) pode ser explicado por desagregação de algum grumo bacilar.

Tratámos, então, de verificar si essa substancia seria reativada:

A) Pela adição de maior quantidade de e. g. t.
 B) Pela adição de sôro fresco de cobaia nova.

A) Ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. juntou-se 1 cc de e. g. n. (tubo a); ao tubo que continha 1 cc de e. b. t. + 1 cc de e. g. t. juntou-se 1 cc de e. g. t. tubo b).

Médias das contajens feitas 24 horas depois da permanencia na estufa a 38° c.

Tubo a) = 23,04.

Tubo b) = 13,85.

Relações entre as contajens feitas antes e depois da nova adição de emulsões ganglionares:

$$\text{e. g. n. } \frac{31.1}{17.9} = 1,73 \quad \text{e. g. t. } \frac{23.4}{13.8} = 1,69$$

B) A 0,75 cc do tubo a juntou-se 0,05 cc de agua fisiologica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova tubo a).

A 0,75 cc do tubo b juntou-se 0,05 cc de agua fisiologica + 1 cc de sôro fresco de cobaia nova (tubo b).

Médias obtidas 48 horas depois da ação do sôro á temperatura de 38° c.

Tubo a) = 10,9 bacilos por campo.

Tubo b) = 06,2 » » »

Expérience II

1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. t.
 1 cc e. b. t. + 1 cc e. g. n. (témoin).
 1 cc e. b. t. + 1 cc v. (témoin).

On a agi de façon identique à celle de l'Expérience I.

Voici les résultats obtenus:

Nous voyons par l'examen de ces résultats que le produit de l'extraction des ganglions normaux n'a pas d'influence sur les bacilles de la tuberculose; d'un autre côté, les ganglions tuberculeux caséifiés contenaient une substance dont l'action se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact (Exp. I). La petite augmentation observée dans le nombre de bacilles de 96 à 120 (Exp. II) peut s'expliquer par la désagrégation d'un grumeau bacillaire.

Nous avons ensuite tâché de vérifier si cette substance pouvait être réactivée:

A) Par l'addition d'une plus grande quantité de e. g. t.

B) Par l'addition de sérum frais d'un cobaye jeune.

A) Au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. n. on a ajouté 1 cc de e. g. n. (tube a); au tube qui contenait 1 cc de e. b. t. + 1 cc e. g. t. on a ajouté 1 cc de e. g. t. (tube b).

Moyennes des comptages effectués 24 heures après une permanence dans l'étuve à 38° c.

Tube a) = 23,04.

Tube b) = 13,85.

Rapports entre les comptages effectués avant et après la nouvelle addition d'emulsions ganglionnaires:

$$\text{e. g. n. } \frac{31.1}{17.9} = 1,73 \quad \text{e. g. t. } \frac{23.4}{13.8} = 1,69$$

B) A 0,75 cc du tube a on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube a).

A 0,75 cc du tube b on a ajouté 0,05 cc d'eau physiologique + 1 cc de sérum frais de cobaye (tube b).

Moyennes obtenues 48 heures après l'action du sérum, à la température de 38° c.

Tube a) = 10,9 bacilles par champ.

Tube b) = 6,2 » » »

Relações obtidas pelas contagens feitas antes e depois da ação do sôro:

$$\text{antes } \frac{23,4}{13,8} = 1,73 \text{ relação entre } a \text{ e } b$$

$$\text{depois } \frac{10,9}{06,2} = 1,79 \text{ relação entre } a) \text{ e } b)$$

o que indica não ser essa substancia reativada por adição de maior quantidade della, nem pelo sôro de cobaia nova.

O aquecimento entre 65 e 70° c., durante 1 hora destrôe essa substancia. E' o que resulta da seguinte tabela:

	N. de bacilos por campo		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tubo 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	03,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (aquecido entre 65 e 70°, durante 1 hora)	9,03	22,00	13,00
Tubo 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Restava indagar si essa substancia, que até então se comportava como fermento, exercia sua ação sobre as cêras incluídas no corpo do bacilo.

Utilizámo-nos, então, de ganglios tuberculosos caseozos de boi de onde extraímos a substancia ativa do seguinte modo: determinado pezo de ganglios tuberculosos caseozos triturados era emulsionado em 5 vezes o seu pezo de agua fisiologica glicerinada a 10% e fenicada a 0,5%, sua emulsão permaneceu na estufa por trez dias, sendo depois reduzida em B. M. a 38° C. ao decimo de volume. Depois da emulsão passada em tamiz procede-se á separação dos elementos solidos em suspensão, por centrifugação. A parte liquida, separada por decantação encerra a substancia ativa e deve ser conservada ao abrigo do ar e da luz.

Tomando uma pequena porção desse extrato glicerinado e tratando-o pelo alcool absoluto forma-se um precipitado que, lavado sobre filtro de papel repetidas vezes pelo alcool para acarretar as substancias gordurozas nelle soluveis, se redissolve facilmente em agua fisiologica.

Essa substancia em solução mostra ação francamente saponificante sobre a cêra ex-

Rapports obtenus par les comptages effectués avant et après l'action du sérum:

$$\text{avant } \frac{23,4}{13,8} = 1,73 \text{ rapport entre } a \text{ et } b$$

$$\text{après } \frac{10,9}{6,2} = 1,79 \text{ rapport entre } a) \text{ et } b)$$

ce qui prouve que cette substance n'est pas «reactivée» par l'addition d'une plus grande quantité d'elle-même, ni par le sérum de cobaye.

Le chauffage de 65 à 70° c, pendant 1 heure, détruit cette substance. C'est ce qu'on déduit du tableau suivant:

	N. de bacilles par champ		
	24 h.	48 h.	72 h.
Tube 1: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t.	6,12	2,03	3,02
» 2: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. t. (chauffé pendant 1 heure, de 65 à 70°)	9,03	22,00	13,00
Tube 3: 1 cc e. b. + 1 cc e. g. n.	11,04	10,45	13,03

Il nous restait à chercher si cette substance qui agissait, jusqu'alors, comme un ferment, exerçait son action sur les cires contenues dans le corps du bacille.

Nous nous sommes alors servi de ganglion tuberculeux caséux de bœuf d'où nous extrayions la substance active comme suit: Une certaine quantité de ganglios tuberculeux caséux triturés était émulsionnée en 5 fois son poids d'eau physiologique glicerinée à 10% et phéniquée à 0,5%. Cette émulsion est restée trois jours dans l'étuve; après, elle a été réduite au B. M., à 38° C, au dixième de son volume. Après avoir passé l'émulsion au tamis, on a séparé les éléments solides en suspension par centrifugation. La partie liquide, séparée par décantation referme la substance active et doit être conservée à l'abri de l'air et de la lumière.

En prenant une petite quantité de cet extrait glicériné et en le traitant par l'alcool absolu, il se forme un précipité qui, après avoir été lavé plusieurs fois avec de l'alcool, sur un filtre en papier, pour faire disparaître les substances grasses solubles qu'il renferme, se dissout de nouveau facilement dans de l'eau physiologique.

Cette substance dissoute dans l'eau physiologique montre une action franchement sa-

traída pelo xilol do bacilo da tuberculose, quando permanece na estufa a 38° C. durante 24 ou 48 horas. Dêmos a essa substancia a denominação de tuberculo-ciraze.

Uzando tecnica adequada pudemos obter, em virtude dessa saponificação, cristais de palmitina, reunidos em feixes, assim como graxas córaveis pelo *Sudão* e, palidamente, pelo acido osmico.

Procedemos do seguinte modo: Um pouco de tuberculo-ciraze dissolvida em agua fizio-
lojica, apoz precipitação e lavagem repetida pelo alcool, era posta em contato com um fragmento de cêra de bacilos da tuberculose, extraída pelo xilol e precipitada pelo alcool absoluto fervente que, mantendo-a dissolvida e em fuzão, devia acarretar as substancias gordurozas soluveis nelle, cazo ellas existissem aí adherentes aos fragmentos de cêra. Como testemunhas empregámos tubos contendo respectivamente cada um, agua fizio-
lojica e tuberculo-ciraze, agua fizio-
lojica e cêra.

Depois de permanecerem em contato na estufa a 38°, por 48 horas, foram esses tubos tratados pelo alcool absoluto em excesso e levados á ebulição. Apoz o resfriamento, filtravam-se os licores alcoolicos em filtros para precipitado.

O liquido alcoolico era então tratado por uma solução de soda muito diluida e levada á ebulição.

Deixava-se resfriar; tratava-se depois por uma solução muito diluida de acido sulfurico; fervia-se; deixava-se novamente resfriar. Tratava-se pelo eter.

Apoz a separação das duas camadas, decantava-se a camada eterea sobre um tubo contendo agua distilada. Deixava-se evaporar o eter; quando a evaporação era quazi total, tratava-se pelo *Sudão*.

Examinando em gota pendente encontrava-se, *sómente no tubo que continha cêra e tuberculo-ciraze* sobre a superficie do liquido globulos de gordura perfectamente córados, de mistura com grande quantidade de cristais de materia corante. Depositando uma gota de eter que sobrenadava á agua em uma lamina, antes de fazer ajir a materia corante,

ponifiante sur la cire extraite par le xylol du bacille de la tuberculose, quand il reste dans l'étuve à 38° C., pendant 24 ou 48 heures. Nous avons donné à cette substance le nom de *tuberculo-cirase*.

En employant un procédé convenable, nous avons pu obtenir, grâce à cette saponification, des cristaux de palmitine réunis en faisceaux, ainsi que des corps gras pouvant être colorés par le *Soudan* et, faiblement, par l'acide osmique.

Notre méthode a été la suivante: Um peu de tuberculo-ciraze dissoute dans de l'eau physiologique, après avoir été précipité et plusieurs fois lavé par l'alcool, était mise en contact avec un fragment de cire de bacilles de la tuberculose, extraite par le xylol et précipitée par l'alcool absolu. Avant d'être mise en contact avec la tuberculo-cirase, la cire était traitée par l'alcool absolu bouillant qui, la conservant dissoute et en fusion, devait entraîner les substances grasses solubles dans ce vehicule, dans le cas où il y en aurait d'adhérentes aux fragments de cire. Nous nous sommes servi, comme témoins, de tubes contenant, l'un, de l'eau physiologique, et de la tuberculocirase et l'autre, de l'eau physiologique et de la cire. Après être restés pendant 48 heures à l'étuve à 38°, ces tubes ont été traités par l'alcool absolu, en excès, et amenés au point d'ébullition. Après leur refroidissement, on filtrait les liqueurs alcooliques dans des filtres pour précipités.

Le liquide alcoolique était alors traité par une solution de soude très diluée et bouillante. On le laissait refroidir et il était ensuite traité par une solution très diluée d'acide sulfurique; on faisait bouillir et on laissait refroidir de nouveau, puis, on le traitait par de l'éther.

Après la séparation des deux couches, on décantait la couche étherée sur un tube contenant de l'eau distillée. On laissait évaporer l'éther; quand l'évaporation était presque totale, on traitait par le *Soudan*.

En examinant en goutte suspendue on trouvait, *seulement dans le tube contenant de la cire et de la tuberculo-cirase*, à la surface du liquide, des globules de graisse nettement colorés mélangés avec une grande quantité de

pela evaporação do veículo, observava-se uma substancia amorfa solúvel no álcool cuja evaporação ocasionava o aparecimento de cristais.

Tomando o licôr alcoólico acima referido, antes de o tratarmos pela soda, e depositando uma gota sobre a lamina, pela evaporação do veículo, observam-se abundantes cristais morfolojicamente semelhantes á mistura de palmitina e estearina e palhetas aguçadas nas pontas. Para ponto de fusão desses cristais encontramos 75° C.

A separação dos alcooles constituintes da cêra, obtidos pelo tratamento do licor com o eter, apoz a saponificação pela soda, não nos revelou a existencia de colessterina, izo-colessterina e fitosterina, quando sujeitados ás reações respectivas.

Pensamos pois que se tratam de alcooles izomeros com esses.

Concluzões

1.º A acido rezistencia do bacilo da tuberculose não é devida exclusivamente ás cêras e gorduras existentes no corpo do bacilo.

2.º O bacilo da tuberculose pode ser diferenciado nitidamente dos pseudo-tuberculosos por metodos de coloração especiais que revelam as granulações do interior do bacilo.

3.º Essas granulações têm eletividade para o Gram, em relação ao resto do bacilo.

4.º Essas granulações representam a forma de maior rezistencia do bacilo.

5.º Nos ganglios tuberculosos cazeificados existe uma substancia capaz de diminuir, *in vitro*, o numero de bacilos da tuberculose, em dada emulsão.

6.º Essa substancia não é reativada pelo sôro fresco de cobaia nova.

7.º A ação maxima dessa substancia se exerce até 120 horas de contato.

8.º Essa substancia é destruida pelo aquecimento entre 65° e 70°, durante 1 hora.

cristaux de la matière colorante. En déposant sur une lame une goutte de l'éther qui surnageait, avant de faire agir la matière colorante, par l'évaporation du véhicule, on observait une substance amorphe soluble dans l'alcool, et dont l'évaporation donnait lieu à la formation de cristaux.

En prenant la liqueur alcoolique citée ci-dessus, avant de la traiter par la soude et en déposant une goutte sur la lame, l'évaporation du véhicule nous permet d'observer une grande abondance de cristaux, d'une forme semblable à un mélange de palmitine et stéarine, et de paillettes à deux pointes aigues. Le point de fusion de ces cristaux est de 75° C.

La separation des alcools constitutifs de la cire, obtenus par le traitement de la liqueur avec l'ether, après la saponification par la soude, ne nous a révélé l'existence, ni de cholestérine, ni d'isocholestérine, ni de phytostérine, après avoir été soumis aux réactions nécessaires.

Nous pensons donc qu'il s'agit d'un autre isomère de la cholestérine.

Conclusions

1. La résistance du bacille de la tuberculose aux acides n'est pas due exclusivement aux cires et aux graisses contenues dans le corps du bacille.

2. Le bacille de la tuberculose peut être nettement différencié des pseudo-tuberculeux par des méthodes de coloration spéciale qui révèlent les granulations de l'intérieur du bacille.

3. Ces granulations ont de l'électivité pour le Gram par rapport au reste du bacille.

4. Ces granulations représentent la forme de plus grande résistance du bacille.

5. Dans les ganglions tuberculeux caséifiés il existe une substance capable de réduire *in vitro* le nombre des bacilles de la tuberculose, en une émulsion déterminée.

9. Cette substance n'est pas reactivée par l'action du sérum frais de cobaye.

7. L'action *maxima* de cette substance se fait sentir jusqu'à 120 heures de contact.

9.º Essa substancia atúa sobre a cêra do bacilo da tuberculose, saponificando-a.

10 A saponificação da cêra por essa substancia mostra a existencia de palmitina e estearina, caraterizadas pela morfologia e ponto de fuzão dos cristais.

11 Essa substancia entra na classe dos enzimas idrolizantes.

8. Cette substance est détruite par le chauffage entre 65 e 70º, pendant 1 heure.

9. Cette substance saponifie la cire du bacille de la tuberculose.

10. La saponification de la cire par cette substance a montré l'existence de palmitine et stéarine, caractérisées par la morphologie et le point de fusion des cristaux.

11. Cette substance entre dans la classe des enzymes hydrolysants.