# CAPITULO VIII

Cultivo de anaerobios sobre medios sólidos. — Cultivo de anaerobios en la gelatina. — Cultivo de anaerobios sobre patatas. — Separación de los microbios anaerobios en los medios sólidos. — Método de Fraenkel. — Método de Vignal. — Método de Roux — Coloración de las preparaciones. — Soluciones alcohólicas saturadas. — Soluciones hidro-alcohólicas. — Soluciones compuestas. — Azul Löffler. — Azul fénico de Kühne — Violeta fénico de Nicolle. — Licor de Ziehl. — Licor de Ehrlich. — Licor de Gram. — Esencias — Bálsamos.

BIBLIOGRAFÍA. — Thoinot: Préc. de Microb. — Würtz: Techniq. bact. — Duclaux: Ann. Pasteur. — Thionville: Chim. des êtres monocell.

Cultivo de anaerobios sobre medios sólidos. — Los cultivos sobre gelatina, gelosa, ó gelatina-gelosa se verifican por los mismos procedimientos.

Los cultivos sobre patatas exigen una técnica particular, de la cual nos ocuparemos separadamente.

Cultivo de anaerobios en la gelatina. — Hay un procedimiento que no exige ni aparato para hacer el vacío, ni gas inerte. Este procedimiento se funda en la adición á los medios nutritivos de substancias fácilmente oxidables y que por tanto favorezcan el desarrollo de los anaerobios sembrados en estos medios.

Según Kitasato y Weil, las substancias oxidables que pueden utilizarse, son:

- $1.^{\rm o}$  Gelosa ó gelatina ordinarias, añadiendo de 0.3 á 0.5 por 100 de formiato de sosa.
- 2.º La misma substancia nutritiva añadiendo 0'1 por 100 de sulfoindigotato de sosa.

La adición de 2 por 100 de glucosa favorece igualmente el desarrollo de los anaerobios.

Para proceder según este método, se llenan tubos de ensayo con el medio nutritivo así preparado hasta 5 c. del orificio del tubo, de modo que la columna azul obscuro de gelosa tenga 10 c. de altura, y se siembra con una aguja de platino bastante larga para depositar el cultivo lo más lejos posible del contacto del aire. Antes de tapar

Tomo"II.

nuevamente el tubo, se verterá para mayor seguridad y por medio de una pipeta, una capa de 1 c. de altura de petróleo ó de aceite esterilizado.

Se tapa el tubo y se le pone en la estufa á 37°. Por regla general, al cabo de 12 horas se producen abundantes gases que pueden lanzar el tapón fuera del tubo. En todos los casos se observa una decoloración del tubo, pues la glucosa y el sulfoindigotato se oxidan fácilmente bajo la influencia del desarrollo de los microbios, apoderándose del oxígeno disuelto ó contenido en el tubo.

M. Würtz ha imaginado un procedimiento de fácil ejecución basado sobre la ebullición del medio nutritivo bajo una corriente de gas inerte. Cuando el aire ha sido desalojado del medio nutritivo, se vierte sobre el medio una capa de líquido aislador como el petróleo ó el aceite. Se deja enfriar y se siembra bajo una corriente

de gas. El procedimiento es el siguiente:

Se toma un tubo de gelosa azucarada al 2 por 100 y se fija verticalmente por medio de un soporte cualquiera. Se reemplaza el tapón de algodón por un tapón de cauchuc provisto de dos tubos de cristal. (Fig. 67). El tubo encorvado que por su parte inferior debe llegar cerca de la superficie del líquido, está enlazado con un tubo de gas del alumbrado. Se hace pasar la corriente del gas durante 5 minutos, y en este tiempo se hace hervir la gelatina por medio de la lámpara. Mientras el gas del alumbrado pasa por el tubo, no puede disolverse en la gelosa que está en ebullición, y al cabo de 4 ó 5 minutos se vierte por el pequeño embudo que se ve á la izquierda del grabado, 1 ó 2 cc. de petróleo esterilizado.

En seguida se deja que se solidifique el medio por enfriamiento. Se quita el tapón de cauchuc y se le reemplaza por el de algodón.

Para verificar la siembra se inclina el tubo de manera que quede descubierta la mitad de la superficie de la gelosa y se hace la siembra por medio de un hilo de platino montado sobre un tubo de cristal relacionado por medio de un tubo de cauchuc con una corriente de gas que está abierta durante el tiempo de la operación.

Debemos á M. Roux la descripción de dos procedimientos, de los cuales vamos á ocuparnos con las mismas palabras de su autor. Sólo añadiremos que la gelatina está contenida en un tubo de ensayo, estirado en su parte superior y formando un tubo bastante delgado para que pueda ser fácilmente cerrado al soplete y tapado

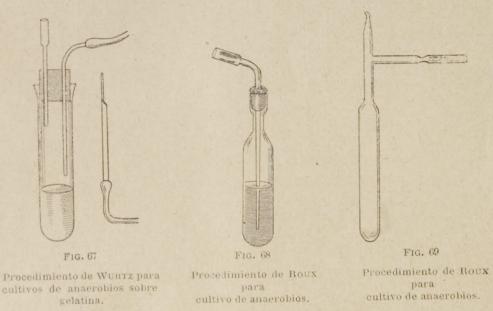
con un tapón de algodón.

«Cuando la gelatina se ha licuado en un baño de agua caliente, se hace penetrar por el orificio superior un tubo de pequeño calibre (Fig. 68) que no cierra completamente la abertura y que conduce una corriente de gas inerte privado de aire. Este tubo ha sido cuidadosamente esterilizado y lleva un tapón de algodón que detiene las impurezas que podría arrebatar la corriente gaseosa. De esta manera el aparato se encuentra pronto privado de aire. Entonces se quita el tubo aductor elevándolo sobre el nivel de la gelatina,

la cual se solidifica por enfriamiento, y dejando que continúe la corriente del gas fuera de la gelatina y dentro del tubo. Esta corriente impide la introducción del aire exterior, y separando el algodón que cierra el orificio del tubo, se introduce un hilo de platino cargado de la semilla y se practica la siembra en la gelatina.

»El tubo aductor es retirado enseguida y se cierra á la lámpara el tubo grueso, evitando así en absoluto la introducción del aire.»

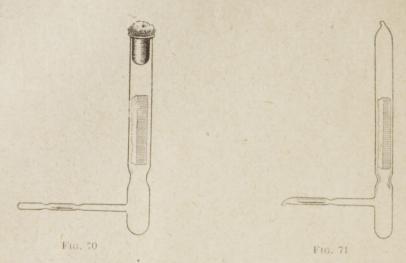
También puede emplearse para cultivo de anaerobios un aparato representado en la Fig. 69. Para hacer uso de él se cierra la tubulura superior por debajo del tapón de algodón y se practica una estrangulación en la tubulura horizontal, empujando el algodón



hasta esta estrangulación, procurando que quede inmóvil: en este caso el aparato tiene la forma que representa el grabado. Fúndese la gelatina á una temperatura lo más baja posible y se adapta la tubulura lateral á una máquina de vacío. Por dos ó tres veces se hace pasar por el interior del tubo el gas inerte del gasómetro. Privado el aparato del aire, se le deja enfriar manteniéndolo en comunicación con el gasómetro, y cuando la gelatina se ha solidificado, se rompe la extremidad de la tubulura superior por la cual se introduce el hilo de platino para hacer la siembra y se cierra en seguida á la lámpara dicha abertura del tubo.

Cultivo de anaerobios sobre patata. — El procedimiento que vamos á describir es debido á M. Roux. Se suelda á un tubo representado por la Fig. 70 otro tubo de menor diámetro en la disposición marcada por la figura. Después de haber introducido un pedazo de patata, se esteriliza el todo en la autoclava, y cuando la superficie de la patata está agotada, se siembra el organismo que se desea cultivar, y se cierra á la lámpara la parte superior del tubo. La tubulura lateral se pone en comunicación con la bomba de mer-

curio, y se hace escrupulosamente el vacio. El pedazo de patata es mantenido durante algunos instantes bajo el vacío de la máquina para que el aire que contiene se escape, y después se cierra á la lámpara la extremidad de esta tubulura lateral. El aparato queda en la forma que marca la Fig. 71, y á través de sus paredes es fácil observar los progresos y desarrollo de los cultivos.



Cultivo de anaerobios sobre patatas, (Método de Roux.)

Separación de los microbios anaerobios en los medios sólidos.—Con frecuencia conviene separar unas de otras las especies de cultivo, para lo cual existen diferentes procedimientos entre los cuales ele-

giremos los que nos parecen más sencillos y prácticos.

Método de Fraenkel. — Empléase un tubo de ensayo cerrado por un tapón de cauchuc, por el cual pasan dos tubos encorvados en ángulo recto, uno de entrada que penetra hasta el fondo del tubo y otro de salida que sólo sobresale un poco por la parte inferior del tapón. Estos dos tubos están previamente afilados en su parte exterior y cerrados con tapones de algodón. (Fig. 72.) El tubo de ensayo y el medio nutritivo han sido esterilizados convenientemente haciendo pasar por ellos una corriente de hidrógeno. Cuando el aire ha sido completamente desalojado, se cierran á la lámpara las dos afiladuras, primero la de salida y después la de entrada, y se extiende la gelatina sobre la pared del tubo.

El tapón de cauchuc y los tubos deben ser cuidadosamente esterilizados. Para evitar la difusión del hidrógeno, y para que no pueda ser reemplazado por el aire, Fraenkel recomienda cubrir con para-

fina el tapón y la extremidad del tubo.

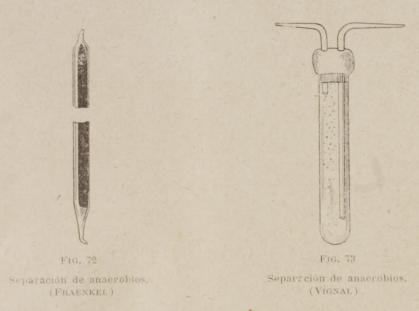
Método de Vignal. — Este autor se sirve de tubos de cristal de un diámetro interior de 3 á 4 milimetros y de un metro de largo. Estos tubos están afilados por una de sus extremidades, y por la otra se practica una estrangulación que se cierra con un tapón de algodón, y después se esteriliza á la lámpara.

En otro tubo de ensayo se hace hervir la gelatina nutritiva, se la deja enfriar en una corriente de hidrógeno, y se la siembra en presencia de este gas á unos 25°. Cuando los gérmenes han quedado completamente repartidos, se aspira la gelatina en el tubo de cristal por la extremidad afilada, se cierran las dos extremidades y se abandona el tubo á sí mismo. (Fig. 63.)

Los anaerobios se desarrollan en pequeñas colonias que, si los gérmenes han sido bien diluídos, están perfectamente aisladas unas

de otras.

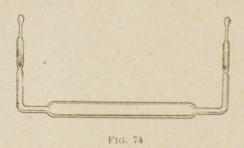
Para aislar los microbios de estas diversas colonias, se corta á un nivel dado el tubo de cristal después de haber lavado con bicloruro mercúrico y con alcohol absoluto y secado con papel esterilizado, y se toma los ejemplares por medio del hilo de platino.



Método de Roux. — Se toma un tubo de cristal cerrado con un diámetro próximamente de tres centímetros y una longitud de 25 á 30 centímetros, y terminado por un tubo más estrecho cerrado por un tapón de algodón. Este tubo contiene un poco de gelatina esterilizada; se funde esta gelatina y se introduce con las precauciones ordinarias una cantidad conveniente de la semilla para obtener colonias separadas. Sembrando muchos tubos con cantidades de semillas más ó menos pequeñas, se llega siempre á una separación perfecta de las colonias. Se estrangula el tubo con la lámpara un poco más arriba del tubo grueso, se empuja el algodón obturador hasta esta estrangulación, y se estira el tubo de menor diámetro.

El aparato, dispuesto de esta manera, se pone en comunicación con la máquina de vacío, y se le deja sin aire. Para separar las dos partes del tubo, se le funde por encima de la estrangulación, y se le encorva en ángulo recto quedando la gelatina en la pared inferior. Cuando ésta se ha congelado, y como la capa es muy delgada, se puede examinar, á través de las paredes del tubo, la forma de las colonias. Para sacar cada una de ellas se abre la punta afilada, se deja entrar el aire ó el gas inerte que se filtran sobre el algodón, se rompe el tubo por la estrangulación, y con un largo hilo de platino ó una varilla de cristal un poco encorvada en su extremidad, se puede recoger la colonia que se quiera sembrar.

Si los microbios licuan la gelatina y no puede invertirse el tubopara el examen microscópico, se hace en él un trazo con una lima, y después con un carbón de Berzelius se completa la sección del tubo. Por la abertura se puede introducir un diamante montadosobre una varilla rígida y hacer un trazo interior en cada pared del tubo. Entonces se separan los dos semicilindros, y el trozo inferior podrá ser examinado al microscopio como una placa ordinaria.



Tubo para cultivo de los anaerobios.

Según el mismo autor, se puede evitar el empleo de una máquina aspirante por medio de una corriente de gas inerte. El tubo representado en la Fig. 74, da una idea de este procedimiento. Hállase estrangulado en sus dos extremidades verticales, en las cuales se han puesto también tapones de algodón. La rama lateral de la izquierda se pone en comunicación con el gasómetro, y se hace que el gas inerte pase á través de la gelatina y saliendo por la otra extremidad vertical. Cuando el aparato está bien purgado de aire, se deja solidificar la gelatina bajo la corriente del gas, cuyo medio se establece sobre las paredes del tubo horizontal, y entonces se cierran sus dos extremidades.

Coloración de las preparaciones. — La coloración de los microbios, que constituye uno de los más importantes progresos en la técnica bacteriológica, se realiza por medio de los colores de anilina.

Dividense estos colores en dos clases, básicos y ácidos. Entre los primeros se encuentran:

- 1.º Colores rojos: fuchsina, rubina, rojo diamante.
- 2.º Violeta: violeta de genciana, violeta de metilo, violeta dahlia, tionina.
  - 3.º Azul: azul de metileno, azul victoria.
  - 4.º Verde de metileno, vesubina, gris de Bismarck.

Los principales colores ácidos son: eosina, tropeolina y fluoresceína.

Las materias colorantes de los microbios se toman de los colores básicos, siendo los más comunes el rojo, violeta y azul. El verde de metilo se usa raras veces, y la vesubina y el gris Bismarck son principalmente colores de fondo. Todos estos colores se encuentran en el comercio bajo la forma de polvo ó de cristales. Con ellos se hacen soluciones alcohólicas saturadas y soluciones hidroalcohólicas.

Soluciones alcohólicas saturadas. — Para obtenerlas se pone en un frasco cerrado al esmeril una cantidad considerable del color que se desee, en polvo ó en cristales, y después se vierte alcohol de 90° ó alcohol absoluto, el cual disuelve una parte del polvo. La saturación se indica por el depósito que se forma en el fondo del frasco

por el exceso de materia colorante.

Soluciones hidroalcohólicas. — Se las emplea con el objeto de obtener coloraciones instantáneas. Para obtenerlas se toma un vidrio de reloj bien limpio, en el cual se pone agua destilada. Este agua se colorea por medio de dos ó tres gotas de una solución alcohólica saturada con un color cualquiera de anilina. Estas soluciones deben ser preparadas en el momento preciso de su uso, y han de dar un líquido cuyo color sea más bien pálido que subido.

Soluciones compuestas. — Existe de ellas un número considera-

ble. Entre las principales citaremos las siguientes:

Azul Löffler. — Se mezclan intimamente:

Potasa á la 1/10,000								3	cc.
Solución alcohólica	de	azul d	le meti	lo.				1	9

Azul fenicado de Kühne. — Se ponen en un mortero 1'5 partes de azul de metileno con 10 de alcohol absoluto. Se añade sucesivamente 100 partes de una solución á 5 por 100 de ácido fénico en el agua. El conjunto se deshace y disuelve evitando los choques violentos, y si no se ha de hacer uso frecuente de esta disolución, sólo se prepara la mitad de ella, porque á la larga disminuye el poder colorante del azul de metileno.

Otro procedimiento para preparar este azul es el siguiente:

Azul de metileno					0		2 g	ramos.
Alcohol absoluto								
Agua fenicada al								))

Violeta fenicado de Nicolle. — Este color se prepara según la siguiente fórmula:

Solución saturada de violeta	de	genciana	en	alco	ohol	á	95°.	10	cc.
Agua fenicada al 1 por 100								100	1)

#### TIONINA FENICADA DE NICOLLE

Solución saturada	de tionina	en	alcohol	á 50°			10	cc.
Agna fenicada al							100	

#### Licor de Ziehl.

Fuchsina	291				1			20		1	gramo
Alcohol absoluto						-				10	))
Agua fenicada al											

Licor de Ehrlich. — Se le puede preparar con la fuchsina, la rubina ó el violeta de genciana:

a)	Agua de anilina															9	cc.
	Alcohol absoluto																
	Solución alcohóli	ca	sat	ur	ada	a de	e fi	uch	sin	a ó	de	rı	ıbiı	na		1	))

### b) También puede emplearse esta otra fórmula:

Agua de anilina			. 1				-	9	cc:
Alcohol absoluto				 	 			1	9
Solución alcohóli									

#### Licor de Gram.

Agua de anilina							41		10	cc.
Alcohol absoluto								4	1	0
Solución alcohólic										

El agua de anilina cuyo empleo es muy frecuente en la técnica bacteriológica, se prepara de la manera siguiente: se pone en unfrasco de cristal de color una cantidad de aceite de anilina de modoque llene la cuarta parte de dicho frasco, llenándolo en seguida de agua destilada y agitándolo fuertemente. El exceso de aceite cae al fondo del recipiente quedando encima el agua cargada de dichoaceite, á la cual se da el nombre de agua de anilina.

Todas estas soluciones, á excepción de los líquidos de Ziehl, Kühne y Weigert, cualesquiera que sean, deben ser preparadas en el momento preciso en que hayan de emplearse y deben ser filtradas antes de ponerlas en el vidrio de reloj. Son de uso general y las de uso especial las indicaremos adelante.

En la técnica de las coloraciones de los microbios se emplean algunas otras substancias entre las cuales se encuentran:

- 1.º Carmín borácico, el cual se prepara añadiendo á una solución al 4 por 100 de bórax un 4 por 100 de carmín y calentando hasta la ebullición. Al líquido caliente se añade una cantidad igual de alcohol á 70°, se deja reposar y se filtra después de cinco días.
- 2.º Picrocarmín de Rouvier. Se vierte en una solución saturada de ácido pícrico, carmín disuelto en el amoníaco hasta la saturación, y se evapora en la estufa hasta la reducción de los ½. El líquido enfriado deja un depósito poco rico en carmín que se separa por filtración. Las aguas evaporadas dan el picrocarmín sólido bajo la forma de un polvo cristalino de color ocre rojo. Este polvo debe disolverse enteramente en el agua destilada, siendo la más conveniente una disolución á ½.

#### 3.º Picrocarmin de Orth:

Esencias. — Sirven como líquidos ó simplemente para esclarecer las preparaciones. Las de uso más frecuente son:

Esencia de clavo.

Esencia de bergamota.

Aceite de cedro.

A las esencias se aproximan el aceite de anilina blanco que se conserva en frascos de color.

También se emplea el xylol ó xyleno.

Bálsamos. — Empléanse generalmente el bálsamo del Canadá y el del Perú que deben disolverse en el xylol, debiendo ser rechazados los disueltos en el cloroformo. La resina dámmar llena el mismo objeto que estos bálsamos.

## CAPÍTULO IX

Estudio microscópico de los microorganismos. — Examen de los cultivos líquidos y sólidos sin coloración. — Examen sin coloración de cultivos que proceden de medios sólidos. — Examen de cultivos líquidos con coloración. — Examen de los cultivos procedentes de medios sólidos con coloración. — Examen de los líquidos de las pulpas orgánicas. — Examen de la sangre con coloración. — Examen de las serosidades peritoneal, pleural y pericárdica con coloración. — Examen de las pulpas de órganos y de la médula de los huesos con coloración. — Examen de los músculos con coloración. — Examen del pus con coloración. — Coloración de los cirros ó flagelos de los microbios. — Mordientes. — Solución colorante. — Investigación de los microbios en los cortes de tejidos orgánicos. — Preparación de cortes con el microtomo para congelación. — Coloración y montaje de los cortes. — Coloración doble por la fuchsina y el verde de anilina. — Preparación, coloración y montaje de los cortes hechos con el microtomo á parafina. — Fijación sobre las láminas de los cortes dados por el microtomo con la parafina.

BIBLIOGRAFÍA. Thoinot: Préc. de bactér. — Wurtz: Bactér. clin. — Duclaux: Annal. Pasteur. — Du Mesnil: Chim. bactér. — Tournemine: Le Laborat. microb.

Estudio microscópico de los microorganismos. — Los microbios para ser estudiados por el microscopio exigen un aumento considerable en sus dimensiones, que puede abarcar de 200 á 1,500 diámetros.

Un buen microscopio, según hemos indicado al principio de este apéndice, debe estar provisto indispensablemente:

- 1.º De un objetivo de inmersión homogénea.
- 2.° De un condensador Abbe.
- 3.° De un diafragma iris.

La descripción y empleo de estos aparatos corresponde á la Fisica elemental.

Examen de los cultivos líquidos y sólidos sin coloración. — Al efecto, se prepara una lámpara de alcohol, una ó muchas pipetas Pasteur esterilizadas y el matraz que contenga el cultivo que se va á examinar. Se afila finamente á la lámpara la extremidad de una pipeta, dando á la parte estirada una dirección un poco oblicua, se rompe la extremidad de esta punta y se somete á la acción de la lámpara de alcohol.

Se abre el matraz tomando las precauciones que dejamos indicadas, se introduce la pipeta en el líquido, se aspira una pequeña cantidad de éste y se tapa cuidadosamente el matraz.

Entonces se toma una lámina de las que, según hemos dicho, deben estar sumergidas en el alcohol, se la enjuga con un lienzo fino y se vierte sobre su superficie una gotita del cultivo contenido en la pipeta. Se toma una lámina más grande y perfectamente limpia, sobre la cual se coloca la pequeña de modo que la cara cargada con el cultivo repose sobre la primera lámina, teniendo cuidado de que el aire no penetre entre ellas.

No falta más que examinar en el microscopio la preparación con el aumento que se desee, separando el condensador y sirviéndose del espejo cóncavo. Entonces pueden observarse puntos, bastoncillos ó filamentos, según la naturaleza del cultivo que se examina, todos ellos refringentes y arrastrados por la corriente del líquido ó dotados de movimientos propios.

También se puede examinar los cultivos sirviéndose de una lámina ahuecada en su centro, llamándose esta manera de operar,

procedimiento de cultivos en células.

En este caso se humedece con ácido sulfúrico la cavidad de la placa, se lava con agua y se enjuga pasándola muchas veces por la llama de alcohol. Cuando la lámina se ha enfriado, se aplica sobre su parte hueca la laminilla, sobre la cual se ha vertido una gota del cultivo que se ha de examinar, teniendo cuidado de que esta gota no toque los bordes del disco hueco, sin lo cual desaparecería entre ambas láminas. Hecho esto se barniza con vaselina blanca los bordes de la pequeña lámina para evitar la evaporación de la gota, obteniendo así una verdadera cámara húmeda, en la cual se ve por medio del microscopio la evolución natural del cultivo.

Examen sin coloración de cultivos que proceden de medios sólidos. — Sobre una laminilla bien limpia se deposita con la pipeta una gotita de caldo esterilizado. Con un hilo de platino fino y esterilizado se coge una muestra del cultivo que se ha de examinar y se la deposita sobre la gota de caldo, terminando la operación como en el caso anterior.

El cultivo en células con semilla procedente de medio sólido es igualmente fácil. Se siembra con una pequeña cantidad de cultivo elegido, tomándolo con el hilo de platino y depositando esta semilla sobre una gotita de caldo preparado en una laminilla, la cual se coloca sobre la excavación de la lámina hueca, como ya hemos dicho.

Por un procedimiento muy sencillo pueden ser examinados los microbios vivos y en movimiento, si la especie es movible, coloreándolos ligeramente, para lo cual se procede de la siguiente manera:

Pónese sobre una lámina una gota de una solución acuosa muy ligera de una materia colorante. Depositase en esta gota una pequeña porción del cultivo líquido ó sólido, se recubre con una laminilla y se lleva al microscopio. Los microbios que aun están vivos se colorean fácilmente, y gracias á este procedimiento pueden ser estudiados ciertos detalles interesantes.

Examen de cultivos líquidos con coloración. — El procedimiento general consiste en verter sobre una laminilla bien enjuta una gotita del cultivo recogido en una pipeta Pasteur. Extiéndese esta gotita sobre la laminilla por medio de la pipeta; sécase aquélla por calefacción colocándola de manera que esté hacia arriba la cara que contiene el cultivo y cuidando que la temperatura no pase de 35 á 40°. Después se sumerge la lámina en la disolución colorante de modo que la cara que contiene el cultivo esté hacia abajo. Cuando se cree que la coloración es suficiente, se retira la laminilla cogiéndola con una pinza, se la lava en un cristalizador que contenga agua destilada para arrastrar el exceso de color, se enjuga con un lienzo fino la cara opuesta á la del cultivo, y se seca sobre la platina de calefacción.

Cuando la laminilla está seca, se esclarece la preparación vertiendo sobre la superficie coloreada una gota de esencia de clavillo, de bergamota ó de aceite de cedro, que después se separa por medio de xilol. Entonces se vierte una gota de bálsamo sobre la cara coloreada de la laminilla, depositándola inmediatamente sobre otra lámina. El bálsamo se extiende y la preparación así montada puede

ser sometida al microscopio.

El examen se hace con aumentos variables, pero siempre con el

condensador Abbe y el espejo plano.

Conviene tener presente que, cualquiera que sea el procedimiento de coloración empleado, el montaje de la laminilla es siem-

pre el mismo.

Examen de los cultivos procedentes de medios sólidos con coloración. — Se toma con el hilo de platino una parte mínima del cultivo que se ha de examinar, mezclándola con una gota de caldo esterilizado colocada sobre una laminilla bien limpia. Se limpia una segunda laminilla que se aplica sobre la cara de la primera que contiene el cultivo, haciéndolas resbalar la una sobre la otra. De esta manera quedan las dos láminas igualmente cubiertas por el líquido y sólo falta colorearlas.

Examen de los líquidos de las pulpas orgánicas. — Cuando este examen se verifica sobre líquidos sin coloración, basta con recogerlos en pipetas de la manera que dejamos indicada, y colocar una gota sobre una laminilla que se pone sobre la otra según ya sa-

La gota se extiende entre las dos láminas y se lleva la prepara-

ción al microscopio de la manera que hemos dicho.

Examen de la sangre con coloración. — Pónese una gotita de sangre sobre una laminilla, extendiéndola después entre dos de éstas v secando la preparación en la platina de calefacción.

Trátase después por una mezcla de alcohol y de éter en partes iguales á fin de fijar bien los glóbulos y disolver las partes grasas. Se seca y se colorea por uno de los procedimientos indicados con coloración simple ó doble si esto es posible.

En las coloraciones simples da buen resultado el licor de Löffler porque permite una especie de doble coloración, tomando los mi-

crobios un azul vivo v los glóbulos un verde pálido.

En las preparaciones de la sangre de las aves da muy buenos resultados la solución hidroalcohólica de violeta de genciana.

En las coloraciones dobles conviene colorear los glóbulos con la eosina.

M. Nicolle aconseja para la doble coloración de la sangre el procedimiento siguiente: fíjase la sangre sobre la laminilla por la mezcla de alcohol y de éter por partes iguales y se colorea con violeta fenicada. Después se trata la preparación durante 4 ó 6 segundos con la eosina yodoyodurada cuya fórmula es:

Yodo											1 g	ramos.
Yoduro de potasio											2	
Agua destilada												-
Solución saturada	de	eo	sin	a er	el el	alc	oho	lá	90		20 c	c.

En este caso se decolora por el alcohol acetona al sexto.

Examen de la serosidad peritoneal, pleural y pericárdica con coloración. — Se pone una gota del líquido sobre una laminilla, se seca, se colorea y se monta como si se tratase de un cultivo líquido.

Para la serosidad peritoneal el mejor procedimiento consiste en colocar laminillas bien limpias sobre la superficie del hígado, que se encuentra siempre cubierto de serosidad. Se seca y se colorea, quedando la laminilla cubierta de esta manera por una capa

uniforme v tan delgada como es posible.

Examen de las pulpas de órganos y de la médula de los huesos con coloración. — Las pulpas deben ser recogidas en el bazo, el higado, etc., y la médula de los huesos debe tomarse en el canal medular. Para hacer una preparación basta con poner una gota de la pulpa sobre una laminilla. Aplícase entonces una segunda laminilla, quedando la gota entre las dos y comprimiéndolas ligeramente entre los dedos se extiende la pulpa en una capa igual. Se seca y se colorea por los procedimientos indicados.

Examen de los músculos con coloración. — Se corta un fragmento de músculo en el lugar en que la lesión está más marcada y con aquel fragmento se frota ligeramente la superficie de una laminilla.

Se seca y se colorea por los procedimientos conocidos.

Examen del pus con coloración. — Guando el pus es líquido, se le coloca entre las laminillas como si se tratase de una pulpa. Si es caseoso se pone una partecilla sobre la lámina y se añade una gota de caldo esterilizado. Con la paleta de platino se mezcla el pus con

el caldo, obteniendo así un líquido opalescente espeso. De este líquido se coloca entre las dos laminillas, se seca y se colorea.

Para los productos patológicos, en general, se emplea la coloración del violeta fenicado ó de la tionina igualmente fenicada. En este último caso la laminilla se sumerge en el baño colorante por uno ó dos minutos, se lava, se seca y se monta.

Coloración de los cirros ó flagelos de los microbios. — Algunos bacilos poseen cirros ó flagelos, á los cuales deben su notable movilidad. El procedimiento para colorearlos comprende el uso de las dos soluciones siguientes:

1.º Mordiente. — A 10 cc. de una solución acuosa de tanino al 20 por 100, se añade gota á gota una solución acuosa de sulfato de hierro hasta que el líquido quede de un color violeta negro. Añádense además 3 ó 4 cc. de un cocimiento de campeche, 1 por 100 de campeche y 8 por 100 de agua, lo que da un líquido de un violeta sucio. Esta solución se conserva durante muchos días, siendo lo mejor tenerla en vasos cerrados. Añadiendo de 4 á 5 cc. de una solución al 5 por 100 de ácido fénico, es más fácil de conservar sin que pierda sus cualidades como mordiente.

2.º Solución colorante. — A 100 cc. de una solución acuosa saturada de anilina, se añade 1 cc de una solución al 1 por 100 de hidrato de sosa, de modo que tenga una reacción francamente alcalina. Añádense después 4 ó 5 gramos de violeta de metilo, de azul de metilo ó de fuchsina, y se agita hasta la disolución, que puede

conservarse durante algunas semanas.

Cuando el líquido que contiene las bacterias que se han de estudiar es pobre en albúmina, en materias mucosas ó en sales, se le extiende directamente sobre el cubreobjetos. En el caso contrario se diluye una pequeña cantidad en una gota de agua destilada, después un poco de ésta en otra y así sucesivamente dos ó tres veces hasta obtener un líquido pobre en albúmina. Estas gotitas se disponen sobre la lámina, se desecan y eligen las más convenientes.

Las laminillas secas al aire y pasadas después por la llama son recubiertas de una capa de mordiente y mantenidas á una distancia de la llama tal que el líquido produzca ligeramente humo. Al cabo de un momento se vierte el exceso del líquido, se lava especialmente sobre los bordes y se sigue los demás procedimientos conocidos.

Investigación de los microbios en los cortes de tejidos orgánicos.— La coloración de estos cortes constituye uno de los puntos más importantes de la técnica bacteriológica, puesto que este procedimiento nos demuestra la presencia y el asiento de los microorganismos en los diversos tejidos y nos da cuenta de las lesiones que provocan,

Estos cortes se colorean por dos métodos principales:

1.º Métodos de coloración simple, en los cuales toda la prepa-

ración está uniformemente coloreada, pero los microbios destacan sobre el tejido por un tinte más vivo.

2.º Los métodos de doble coloración, en los cuales los microbios aparecen teñidos de un color y el fondo de otro.

La técnica de la manipulación de los cortes difiere un poco según que el corte ha sido hecho por unos ú otros de los microtomos que generalmente se emplean, entre los cuales deben preferirse: el microtomo por congelación y el microtomo por la parafina.

Toda pieza destinada á ser cortada para el examen bacteriológico, debe ser dividida inmediatamente después de la autopsia en pequeños fragmentos cúbicos de medio centímetro de lado, los cuales se colocan en el alcohol absoluto en frascos estrechos y altos, de modo que los fragmentos queden cubiertos por una alta capa de alcohol.

Preparación de cortes con el micrótomo á congelación. — Habiendo permanecido la pieza por lo menos 24 horas en el alcohol absoluto, se la sumerge durante otras 24 horas en una solución de goma esterilizada. Esta goma se infiltra entre las mallas del tejido y forma una especie de armazón interior que da consistencia al tejido.

Una vez engomada la pieza, se lleva al micrótomo donde es cortada según la técnica especial del instrumento, y los cortes son recibidos en un cristalizador lleno de agua destilada donde se les deja durante una hora. Después se les transporta con la paleta de platino al alcohol absoluto, donde se les deja durante otra hora. Pasado este tiempo están dispuestas para recibir la coloración.

Coloración y montaje de los cortes. — La coloración simple por el método de Löffler consiste en sumergir el corte en una solución fresca y filtrada del azul de Löffler durante 10 á 15 minutos. Se decolora rápidamente en el agua destilada que contenga una ó dos gotas de ácido acético para el contenido de un vidrio de reloj.

Enseguida se monta la preparación de la manera siguiente: por medio de la paleta de platino se lleva la preparación á un cristalizador lleno de agua destilada; se toma una lámina bien limpia y se la sumerge oblicuamente en el cristalizador, mientras que con una aguja de cristal se extiende suavemente el corte sobre la lámina colocándolo de manera que no forme ningún pliegue. Quitase la lámina cargada con el corte, se deshidrata por el alcohol absoluto, se seca y se fija sobre la otra lámina por medio de hojas de papel de fumar.

Esclarécese entonces con la esencia de clavillo; se separa el exceso de esencia por el xilol y se deja caer sobre el corte una gota de bálsamo del Canadá disuelto en el xilol, recubriendo el todo con una laminilla bien limpia. En tal caso el baño se extiende y el corte queda montado.

En este método los microbios se colorean en azul obscuro y los otros elementos en azul pálido.

Coloración doble por la fuchsina y el verde de anilina. — Se deshidrata el corte en el alcohol y se colorea por la fuchsina fenicada durante 3 á 5 minutos. Se lava con agua, se sumerge un instante en el alcohol y se diferencia por el verde de metilo anilinado. Este verde de metilo se emplea y se prepara como el azul de metileno, del cual ya hemos hablado.

Preparación, coloración y montaje de los cortes hechos con el micrótomo á parafina. — Las manipulaciones preparatorias á las cuales se ha de someter la pieza que haya de ser cortada por el micrótomo á parafina, son largas y delicadas; la coloración y el montaje exigen cuidado y habilidad, pero las ventajas que proporciona este método son muy marcadas, dando cortes de una regularidad perfecta y de una finura que pueden llegar hasta una milésima de milímetro.

Con este micrótomo se pueden preparar fragmentos de órganos no coloreados ó fragmentos coloreados previamente con el carmín, picrocarmín ó carmín borácico, de donde resultan dos procedimientos diferentes que describiremos sumariamente.

- 1.º Cuando la pieza no está coloreada antes de pasar al micrótomo, se corta en forma cúbica un pequeño fragmento del órgano que se haya de examinar y se le deja endurecer en el alcohol absoluto durante unas 24 horas por lo menos. Al cabo de este tiempo y antes de pasar al micrótomo debe someterse la pieza á las manipulaciones siguientes:
- a) Permanencia en una mezcla en partes iguales de alcohol y de éter durante 24 horas.
  - b/ Permanencia en el éter sulfúrico puro durante 24 horas.
- c) Permanencia en una solución concentrada de parafina en el éter sulfúrico durante 24 horas.
  - d) Permanencia en la parafina fundida á 45° durante 24 horas.

Se deja enfriar la parafina y al coagularse envuelve la pieza. Cuando ha llegado al grado de dureza necesario, esto es, cuando es susceptible de ser limpiamente cortada con el cuchillo, se-corta al rededor de la pieza y por medio de un bisturí un cilindro que se hace penetrar por frotamiento en uno de los orificios redondos del micrótomo, y se procede al corte que puede hacerse en capas de espesores variables, según indica una tabla especial colocada sobre el micrótomo y con cuyo auxilio se gradúa matemáticamente el aparato. Así se obtiene una cinta de cortes parecidos á la Taenia solium, en cada uno de cuyos anillos se encuentra en el centro un corte rodeado de parafina.

En el segundo procedimiento la pieza está coloreada al carmin antes de ser cortada. En tal caso se corta un pequeño fragmento del órgano que se quiere examinar, de modo que se obtenga un volumen de medio centímetro de largo por un cuarto de centímetro de ancho. Se le endurece teniéndolo en el alcohol absoluto durante 24 horas, y se le somete á los procedimientos siguientes:

- a) Permanencia en una solución de carmín nuevamente filtrada, durante 12 horas.
  - bl Permanencia en el alcohol absoluto durante una hora.
- c) Permanencia en una mezcla de alcohol y de esencia de bergamota en partes iguales durante una hora.
- d) Permanencia en la esencia de bergamota pura durante dos horas.
- e) Permanencia en una solución espesa de parafina en la esencia de bergamota durante 2 horas en la estufa de 25 á 30°.
- f) Permanencia en la parafina pura fundida en la estufa de 45 á 50° durante 2 horas.

Se deja solidificar la parafina y se procede como en el primer caso para obtener los cortes. Los anillos de la cinta así obtenidos contienen cada uno un corte coloreado en rosa por el carmín y limitado por una zona de parafina.

Fijación sobre las láminas de los cortes dados por el micrótomo con la parafina. - Sea ó no coloreado el corte dado por el micrótomo, el procedimiento es el mismo. Se toma en la cinta de los cortes dos fragmentos de 5 ó 6 cortes cada uno y se los dispone sobreuna lámina bien preparada de la manera siguiente: la lámina bien limpia y seca ha sido cubierta por una cara y en una superficie de 3 c. de largo por 1 y medio de ancho, por una solución ligera de goma. Sobre esta cara cubierta de goma se ponen los cortes unos debajo de otros y los dos paralelamente al eje mayor de la lámina. Se agota ésta y se la deja secar al abrigo del polvo durante 15 horas próximamente. Al cabo de este tiempo se lleva la lámina sobre la platina de calefacción hasta que la parafina que retiene los cortes quede transparente. Se desaloja la parafina por el xilol y éste por el alcohol y se seca la lámina con hojas muy limpias de papel de fumar. De esta manera los cortes quedan perfectamente fijos sobre la lámina y dispuestos á experimentar las manipulacionesdestinadas á la coloración de los bacilos.

Alguna vez se puede hacer más rápidamente la fijación sobre la lámina, sobre todo cuando se trata sólo de un examen histológico del corte teñido por el carmín. Al efecto se extiende por medio de un pincel sobre la lámina una ligera capa de la solución siguiente:

Después se disponen los cortes como ya se ha dicho, se les fija con el pincel, se funde la parafina, etc., siguiendo la marcha general que dejamos indicada.

### CAPÍTULO X

Clínica bacteriológica. — Modo de recoger la sangre sobre los individuos vivos. — Punción del bazo. — Pulmones. — Manera de recoger las orinas sobre individuos vivos y los cadáveres. — Modos de recoger algunos líquidos patológicos. — Exudados sólidos. — Falsas membranas. — Enfermedades infecciosas de la sangre. — Infecciones sanguíneas. — Estreptococos. — Estafilococos piógenos. — Pneumococo. — Bacilo de Eberth — Examen bacteriológico del pus. — Color del pus. — Olor del pus — Consistencia del pus. — Microbios contenidos en el pus. — Estafilococo piógeno blar co. — Estreptococo piógeno. — Tetrágeno. — Pneumobacilo de Friedlaender. — Bacterium coli. — Bacilo tífico. — Bacilo de la tuberculosis. — Gonococo. — Gangrena.

BIBLIOGRAFÍA. — Würtz: Bactériol. cliniq. — A. Gautier: Toxines. — Duclaux: Annal. Pasteur. — Morin: Malad. infect. — Legaz: Microb. pathol.

Clínica bacteriológica. — Las nociones generales que dejamos apuntadas en lo que precede y el plan que desde el principio nos propusimos, nos obligan á deducir aplicaciones prácticas para que el médico pueda hacer uso de estos conocimientos en su constante lucha contra la enfermedad.

La química de lo infinitamente pequeño abre anchurosos horizontes para los estudios de la patología, creando una terapéutica racional y positiva, que toma sus datos, establece la nosología y etiología sobre bases completamente nuevas y facilita procedimientos igualmente positivos y eficaces para atacar las enfermedades.

Conviene, en primer lugar, conocer de conformidad con las reglas establecidas, los procedimientos más seguros para recoger los productos patológicos que debe utilizar el médico como elemento indispensable de diagnóstico.

Modo de recoger la sangre sobre los individuos vivos. — Puede operarse de dos maneras:

1.º Por picadura del dedo.

2.º Por aspiración de la sangre en una vena del antebrazo.

En el primer caso el procedimiento es sumamente sencillo, pero reclama ciertas precauciones indispensables. El principal objeto que debemos proponernos es obtener una gota de sangre perfectamente aséptica y sin peligro de contaminación.

Ante todo se ha de emplear un instrumento esterilizado, debiendo pasarse la lanceta por una solución de sublimado y después por

la llama de la lámpara.

La esterilización de la superficie cutánea en la cual se va á hacer la picadura no es tan fácil. La piel en su estado normal contiene en su superficie y entre sus pliegues una cantidad considerable de microorganismos que es difícil destruir en poco tiempo, debiéndose gran parte de los errores bacteriológicos en el examen de la sangre á que la piel ha sido desinfectada de una manera deficiente.

El procedimiento más seguro consiste en lavar durante cinco minutos con jabón y agua caliente; frotar la piel con gasa humedecida con alcohol; colocar sobre la región en que se ha de picar un trozo de algodón hidrófilo empapado en una disolución á la milésima de sublimado, dejando este algodón sobre la región durante diez minutos.

Después se lava con alcohol para disolver y arrastrar los residuos del sublimado, y por último, se lava con éter para hacer desaparecer los restos de alcohol.

El lugar generalmente elegido para la picadura es la pulpa del dedo ó la cara dorsal de la segunda falange. La sangre puede reco-

gerse con el hilo de platino ó con una pipeta.

En el segundo caso ó sea para hacer la aspiración de la sangre en una vena del antebrazo, se liga el brazo del enfermo por encima del codo con una fuerte venda. La piel del pliegue del codo es cuidadosamente desinfectada y empleando la jeringa de Straus cuidadosamente desinfectada, se pica la vena y se aspira la sangre con la jeringa. Cuando ésta está llena, se desata la ligadura y se cierra la picadura con un poco de colodión.

Punción del bazo. — Al efecto se hace acostar al enfermo del lado derecho y se esteriliza cuidadosamente la piel. Se determina con cuidado la matidez haciendo que el enfermo suspenda la respiración para evitar los movimientos del órgano y su desgarro posible.

En seguida se punciona con la jeringa de Straus y se recogen nada más que una ó dos gotas de sangre.

La punción del bazo en individuos vivos es una práctica que no carece de peligros. Sólo se punciona en el caso de hipertrofia, y cuanto mayor es el volumen de este órgano, mayores son los peligros de hemorragias subcapsulares ó de derrames sanguíneos en el peritoneo.

Es prudente abstenerse de esta práctica; los escasos resultados que puede dar en clínica, en cuanto al diagnóstico ó en cuanto á la repartición topográfica de los bacilos, no compensan los inconvenientes que puede tener para los enfermos.

Pulmones.—El jugo pulmonar se recoge igualmente con la jeringa de Straus, desinfectando previamente la piel é introduciendo la cánula al nivel de las porciones hepatizadas.

Esta punción ha sido utilizada principalmente para buscar el pneumococo, y es una práctica que, como la punción del bazo, no debe entrar como procedimiento de uso corriente en clínica, por más que al parecer no lleve consigo grandes inconvenientes.

Manera de recoger las orinas sobre individuos vivos y los cadáveres. — Sobre individuos vivos pueden recogerse las orinas de dos maneras: la primera consiste en tomarlas directamente en la vejiga, para lo cual se esterilizan las sondas en la autoclava, se hace aséptico el canal y se sonda al enfermo, teniendo cuidado de recoger la orina en un recipiente esterilizado.

Es conveniente introducir por la sonda antes de la salida de la orina un hilo de platino esterilizado, con el cual se sembrará un tubo testigo, á fin de estar seguro de la asepsia de la sonda.

El segundo procedimiento para obtener la orina, consiste en esterilizar el canal en la extremidad anterior del conducto de la uretra, haciendo después orinar al enfermo y recibiendo en un tubo esterilizado las últimas porciones de la orina, puesto que las primeras pueden estar contaminadas por los saprofitos que existen normalmente en la fosa navicular y en la uretra anterior.

Para tomar las orinas sobre el cadáver se esteriliza con una varilla de cristal calentada al rojo la superficie de la vejiga que se haya de puncionar y se introduce una pipeta Pasteur esterilizada, verificando la aspiración.

Modo de recoger algunos líquidos patológicos. — Ya hemos dicho la manera de recoger sobre individuos vivos el pus y las serosidades. En el anfiteatro conviene recoger en seguida los exudados que poniéndose en contacto con el aire sobre una superficie más ó menos extensa, pueden contaminarse rápidamente. Los líquidos contenidos en cavidades cerradas no tienen este peligro de contaminación.

Exudados sólidos. Falsas membranas. — Para recoger las falsas membranas en la boca de los enfermos, por ejemplo, se emplearán pinceles de algodón. Tómase uno de éstos del tubo en que debe estar contenido, teniendo la boca del enfermo bien abierta, y se introduce el pincel en la faringe teniendo cuidado de no tocar, ni las mejillas, ni la lengua, ni el paladar. Haciendo girar el pincel entre los dedos se limpian las amígdalas y los pilares, cargando del exudado que recubre la mucosa. Después se coloca nuevamente el pincel en el tubo, se tapa éste y puede llevarse al laboratorio sin peligro de contaminación.

Después se sacude fuertemente el pincel en un tubo con caldo y con este caldo así sembrado se procede al examen microscópico, á las siembras y á las inoculaciones.

Si no se tienen á mano los pinceles de algodón esterilizado, puede

emplearse igualmente un hilo de platino bastante rígido para que no se doble al pasar sobre la superficie de las amigdalas.

Todos los exudados sólidos pueden recogerse de la misma manera y ser sometidos al examen microscópico, á la siembra y á la inoculación.

Enfermedades infecciosas de la sangre. — Pueden éstas dividirse

en dos clases:

1.º Enfermedades microbianas septicémicas, en las cuales el microorganismo patógeno penetra de una manera constante ó inconstante en el torrente circulatorio. En esta clase se encuentran las piohemias, la fiebre tifoidea, el muermo, el carbunco, la tuberculosis, etc.

2.º Enfermedades microbianas tóxicas, en las cuales los sintomas y la muerte son determinados por una toxina segregada en un punto del organismo por el microbio patógeno. En esta clase se

encuentran el cólera, la difteria y el tétanos.

Infecciones sanguíneas. Estreptococos.—En las septicopiohemias el estreptococo piógeno se encuentra en el caso en que la enfermedad evoluciona sobre el modo sobreagudo ó agudo. Este microorganismo es el que con más frecuencia se ha encontrado en la sangre, especialmente en las piohemias médicas, quirúrgicas y obstétricas.

La puerta de entrada es muy variable, pudiendo ser una llaga del tegumento ó una escoriación; á menudo la infección se verifica

por medio de una amígdala ó por la faringe.

En las infecciones secundarias de las fiebres eruptivas, y en particular en las de la escarlatina, se ha comprobado el pasaje del estreptococo á la sangre durante la vida.

En la tuberculosis pulmonar se encuentra también con frecuencia el estreptococo en la sangre, especialmente cuando sobreviene

la fiebre héctica.

Estafilococos piógenos. — Se observa la infección sanguinea por estos microorganismos en las mismas condiciones que por el estreptococo.

Se han observado casos de septicemia puerperal con estafilococos; la marcha de la enfermedad en este caso es diferente de la que

se observa en la septicemia con estreptococos.

Las supuraciones con estafilococos, los flemones, los antrax, las osteomielitis, van acompañadas generalmente de infección san-

guinea, cuyo detalle constituye un precioso dato clínico.

Pneumococo. — Encuéntrase en la pneumonia, y la infección sanguínea se observa principalmente en los casos graves que terminan por la muerte. La infección sanguínea por este microorganismo puede observarse también en otras enfermedades, habiéndose comprobado alguna vez su existencia en las infecciones graves procedentes de las úlceras.

Bacilo de Eberth. — Han sido infructuosos los esfuerzos realiza-

dos para aislar este bacilo en la sangre de los tíficos cuando ésta se ha tomado en la vena del antebrazo.

Por el contrario, la sangre tomada á la altura de las manchas de la piel y del bazo, contiene gran cantidad de estos microorganismos.

Encuéntrase igualmente invadido este líquido por los bacilos en la tuberculosis, el carbunco, el muermo, la fiebre recurrente y la malaria durante los accesos.

Examen bacteriológico del pus. — Uno de los problemas que con más frecuencia hay que resolver en la clínica, es el análisis bacteriológico de una colección purulenta. Para realizarlo de una manera conveniente, es preciso tener en cuenta ciertos datos que pueden dar resultados prácticos. Tales datos se fundan en los caracteres físicos del pus que se ha de examinar.

Estos caracteres, por más que no tengan un valor absoluto, son el punto de partida de presunciones importantes, y pueden servir accesoriamente para fijar el diagnóstico. Sucede aquí como en anatomía patológica, pues si se da á un histólogo un corte de tumor para que lo examine, es preciso decirle en qué parte del organismo se ha tomado este producto. Igualmente sucede en el examen bacteriológico del pus, y en cualquier otro líquido patológico.

Color del pus. — En algunos casos en que el microbio piógeno existe en el pus en el estado de cultivo puro, el color del pus presenta un aspecto particular. Obsérvase esto, particularmente, en el bacilo piociánico que comunica al pus un color verde azulado.

El tinte ciánico de las ropas empleadas en la curación, el algodón, los objetos tocados por el pus que contiene este bacilo, constituyen un indicio casi específico de su presencia.

El absceso del hígado, sobre todo cuando es de origen disentérico, da una coloración característica color de vino pero que no presenta ningún carácter específico bajo el punto de vista bacteriológico.

El estafilococo piógeno áureo puede dar en ciertos casos al pus un tono amarillo bien marcado, y el estafilococo piógeno blanco un aspecto lactescente. En las infecciones mixtas, el color del pus no puede dar indicio alguno, á excepción de cuando el pus contiene el bacilo piociánico.

Olor del pus. — El pus es más ó menos fétido, según que en él existan bacterias intestinales ó gérmenes anaerobios ó facultativos. Los abscesos situados cerca de la vejiga, producen un olor especial semejante al de la orina en putrefacción.

Consistencia del pus. — Esta consistencia puede facilitar caracteres diferenciales, por más que no sean específicos. El estafilococo piógeno áureo y el pneumococo dan un pus cremoso y sin olor característico, llamado de buena índole. La densidad y la cantidad del pus no pueden por otra parte facilitar datos seguros sobre la naturaleza de los gérmenes piógenos que contenga.

Microbios contenidos en el pus. - Desde el punto de vista cli-

nico, puede decirse que en casi la totalidad de los casos toda colección purulenta reconoce como causa la presencia de un organismo piógeno. Los microbios de este grupo que se encuentran más comúnmente en el pus son:

1.º Los estafilococos áureo, blanco y citrino.

2.º El estreptococo piógeno.

El estafilococo áureo (Staphylococus aureus), es uno de los agentes más frecuentes de la supuración. Encuéntrase generalmente, en el hombre, en la superficie de la piel y en las mucosas, en el tubo digestivo y en las primeras porciones de las vías respiratorias.

En el estado patológico se encuentra en el pus, cualquiera que sea la localización de la colección purulenta, solo ó mezclado con otros organismos. En la sangre se encuentra también en los casos de infección generalizada y en gran número de lesiones inflamatorias, abscesos, flemones, etc.

Fuera del organismo humano se encuentra en el aire, en el polvo

y en las aguas.

Preséntase en pequeños puntos redondos de 0'9 á 1'2  $\mu$  de diámetro agrupados en conjuntos y formando racimos. Alguna vez se le encuentra también en estado de diplococo en el pus ó en los cultivos.

Es anaerobio facultativo y su temperatura es de 37 á 38°, reproduciéndose ya hacia los 16° y coloreándose bien por todos los colores básicos de anilina. Presenta la particularidad de no segregar pigmento sino después de largo tiempo, y su pigmentación parece que se produce más rápidamente á una temperatura de 20 á 22°.

Es agente patógeno encontrado constantemente en los flemones y abscesos, en la osteomielitis aguda y prolongada, en el antrax y la linfangitis. Puede provocar septicemias primitivas ó consecutivas de los forúnculos y del antrax, y en este caso se encuentra en la

autopsia en la sangre del corazón.

Encuéntrase, finalmente, en el pus, solo ó acompañado de otros microbios, en las complicaciones purulentas de la escarlatina, y en la blenorragia, coexistiendo también con frecuencia con el bacilo de la tuberculosis.

Estafilococo piógeno blanco (Staphylococus pyogenes albus). — Este micrococo vive igualmente como saprofito sobre la piel del hombre y se encuentra casi tan frecuentemente como el anterior en los flemones superficiales. Clínicamente puede ser considerado como una variedad acromógena del precedente. El pus que determina es generalmente de un blanco lechoso. No es exclusivamente piógeno, y puede producir los exudados serosos.

Estreptococo piógeno (Streptococus pyogenes). — Encuéntrase en gran número de afecciones generales y locales, existiendo en estado de pureza ó mezclado con otros microbios piógenos que á menudo

invaden secundariamente la colección purulenta.

Tetrágeno. — Ha sido señalado por Koch en el contenido de una

caverna pulmonar. Encuéntrase en los esputos de los tísicos, en las paredes de las cavernas pulmonares y generalmente en el pus.

También se ha encontrado en la saliva normal y en la de los re-

cién nacidos.

Es un micrococo que tiene de 1 á 2 \mu de diámetro. Por regla general se presentan asociados de cuatro en cuatro en los productos patológicos, y estos cuatro elementos están reunidos por una cubierta gelatinosa que no se observa en los cultivos.

La diferencia que hay entre el tetrágeno y las sarcinas, es que en el primero los cuatro elementos están en un solo plano formando un cuadrado; las sarcinas forman un pequeño cubo con las tres di-

mensiones.



Bacilo de FRIEDLAENDER.

Es anaerobio facultativo y se colorea bien con todos los colores básicos de anilina. Su temperatura óptima es de 37º y se desarrolla lentamente, conservando largo tiempo su vitalidad y su virulencia.

Pneumobacilo de Friedlaender. - Existe normalmente en las cavidades naturales del hombre sano, y en el estado patológico se encuentra en ciertas lesiones del árbol respiratorio como también en el pus.

Es un coco ovalado que tiene próximamente 1 µ de largo, y están reunidos generalmente de dos en dos y algunas veces de cuatro

en cuatro.

En los esputos se encuentran rodeados de una aureola ó cápsula que los envuelve. (Fig. 75.) Estas cápsulas faltan en los cultivos. La forma de este bacilo es completamente diferente en los cultivos de la que presenta en los esputos. Un cultivo examinado al microscopio presenta gruesos filamentos entrelazados, un poco más gruesos que los filamentos del carbunco, y no segmentados. Al lado de estos filamentos se ven gruesos bastoncillos más ó menos largos.

Es aerobio y se colorea con todos los colores de anilina. No toma

la coloración Gram.

Bacterium coli. — Según las observaciones de varios autores, puede producir el pus en determinadas circunstancias. El bacterium coli piógeno determina la formación del pus en ciertos flemones. Experimentalmente este pus es blanco, caseoso, cremoso, sin olor, al contrario de lo que se observa en los abscesos situados cerca del tubo digestivo del hombre.

Observado en el caballo, presenta la forma representada en la Figura 76.



Fig. 76 Coli bacilus del caballo.

Bacilo tífico. — Cuéntase éste también entre los microbios piógenos, siendo las regiones más distantes del tubo digestivo y de sus anejos linfoides donde puede determinar colecciones purulentas.

En la linfangitis tiene la forma representada en la Fig. 77, y se ha comprobado su presencia en los abscesos, en la pared abdominal.

La osteomielitis tífica tiene una localización particular, afectándose con preferencia los huesos largos y especialmente la tibia.

Bacilo de la tuberculosis. — Este bacilo es piógeno, pero de una manera particular, pues produce una necrosis especial de los tejidos que ha contaminado. El pus de las supuraciones tuberculosas es en general un pus seroso ó más bien un líquido seropurulento y blanquecino. En un recipiente no tarda en formar un depósito pulverulento, sobre el cual existe una serosidad turbia. Encuéntrase el bacilo en los focos de supuración caseosa, pero en este caso sólo existe en estado de unidades muy raras. (Fig. 78.)

Gonococo. — Es éste el microbio piógeno por excelencia de la uretra, y puede provocar la supuración sobre otros puntos del organismo.

El proceso blenorrágico es, ante todo, una función epitelial seguida de una inflamación purulenta del tejido conjuntivo subyacente. El organismo patógeno, el gonococo, se encuentra especialmente en el interior de los glóbulos del pus. (Fig. 79.) Los leucocitos



FIG. 77

Linfangitis de la parte profunda de una placa de Peven. (Tifus )

no obran como fagocitos en presencia del gonococo y sólo sirven de vehículo á este último, transportándolo bien fuera del organismo, bien á otras diversas partes del organismo aun no atacadas.

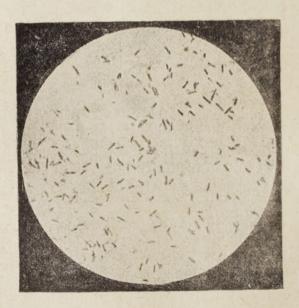


Fig. 78

Bacilo de la tuberculosis.

En el pus de la blenorragia se observan también células eosinófilas. (Fig. 80.)

Gangrena. — La gangrena es un proceso caracterizado por la putrefacción de los tejidos esfacelados.

La patogenia de este proceso dista mucho aun de ser clara, y el estudio de un caso de gangrena constituye uno de los problemas bacteriológicos más delicados y más dificiles de resolver.

Si la gangrena es de origen microbiano, es preciso tener en cuenta que existe gran número de especies diferentes de microorganismos capaces de producirla. Entre estas especies sólo un pequeño número es conocido y son las que poseen la propiedad de esfacelar los tejidos y pudrirlos enseguida, determinando así la gangrena sin el concurso de ningún otro microorganismo. Tal es el vibrión séptico de Pasteur.



FIG. 79



FIG. 80

Gonococo de Neisser en la blenorragia.

Pero en casi todas las observaciones de gangrena donde se han hecho investigaciones bacteriológicas, se han encontrado varios microbios. Los gérmenes aislados son ó aerobios, ó facultativos ó estrictamente anaerobios, habiéndose comprobado la presencia de microbios piógenos y de saprofitos vulgares.

Entre estas especies, unas tienen la propiedad de determinar la mortificación ó el esfacelo de los tejidos, existiendo otras variedades que producen la putrefacción sobre los tejidos esfacelados.

Vese, pues, que el proceso gangrenoso es de origen muy complejo. Si existen microorganismos capaces de determinar la gangrena, las asociaciones microbianas son casi siempre necesarias para engendrarla. En este caso es verosímil que la primera etapa ó el esfacelo sea producido por microorganismos que tengan esta acción patógena especial. La segunda etapa, la putrefacción de los tejidos esfacelados y privados de vida, es un proceso banal procedente de diferentes microbios patógenos ó saprofitos. El examen microscópico demuestra casi siempre una gran variedad en la forma de microorganismos de los focos gangrenosos.

El medio único que da resultado en este género de investigaciones es el examen microscópico y la coloración de las partículas del tejido gangrenado.

# CAPITULO XI

Manifestaciones de las enfermedades infecciosas. — Endocarditis. — Miocarditis. — Arteritis. — Flebitis. — Bacteriología del aparato respiratorio. — Laringe. — Bacteriología de los bronquios. — Bronquitis. — Bronco-pneumonia. — Pneumonia. — Esputos pneumónicos. — Examen de la sangre en la pneumonia. — Complicaciones de la pneumonia. — Tuberculosis pulmonar. — Tuberculosis aguda. — Tuberculosis crónica. — Hemoptisis. — Esputos en la tuberculosis. — Coloración de los bacilos. — Aspecto de los bacilos. — Importancia clínica del examen de los esputos. — Cavernas. — Pleuresias. — Pleuresias hemorrágicas. — Pleuresias purulentas. — Bacteriología del aparato digestivo. — Estomatitis. — Microbiología de los dientes. — Anginas agudas no específicas. — Angina diftérica.

BIBLIOGRAFÍA. — Oski: De la péricard. à pneumoc. — Netter: Soc. méd. des Hôp. — Claisse: Linf. bronch. — Würtz: Bactér. — Straus: Tubercul. — Vignal: Recherch. sur les microrg. — David: Les microb. — Siegel: Deutsche Med. Woch.

Manifestaciones de las enfermedades infecciosas. Pericarditis. — Las punciones de exploración sobre el pericardio no han entrado aún en la práctica, teniendo que contentarnos con el examen bacteriológico del líquido de la paracentesis.

Normalmente existe en el pericardio una pequeña cantidad de líquido serofibrinoso destinado á facilitar el roce entre las dos hojas del pericardio durante la diástole y la sistole cardíacas. Por tanto, podrá recogerse en la autopsia, por medio de una pipeta, algunas gotas de este líquido, que generalmente será séptico, si se ha hecho la autopsia en buenas condiciones, esto es, poco tiempo después de la muerte.

En los animales es muy frecuente, por el contrario, encontrar en el pericardio un exudado poco abundante, turbio ó ligeramente lactescente y que contiene microorganismos, aunque la sangre del corazón no contenga ninguno. Convendrá por consiguiente en toda autopsia bien hecha practicar sistemáticamente el examen bacteriológico del contenido pericárdico, cualquiera que sea su cantidad.

En esta enfermedad se ha encontrado cierto número de especies microbianas en diferentes variedades de exudados del pericardio. Las mismas especies microbianas se encuentran en todas las variedades de pericarditis, ora se trate de líquidos serofibrinosos ó purulentos.

Endocarditis. — Desde 1869, se sabe que hay endocarditis de origen parasitario. La endocarditis aguda puede ser considerada de una manera general como una de las manifestaciones de la infección sanguínea y puede resultar de la acción sobre el endocardio de microbios patógenos.

Desde el punto de vista bacteriológico las endocarditis pueden

ser clasificadas de la manera siguiente:

1.º Endocarditis en las enfermedades septicémicas pudiendo ser constante ó inconstante la infección de la sangre;

2.º Endocarditis en las enfermedades infecciosas tóxicas;

3° Endocarditis en las enfermedades infecciosas, cuyo agente patógeno es todavía desconocido;

4.º Endocarditis en las cuales han sido aislados microorganis-

mos no encontrados aún en otras afecciones.

Miocarditis. — Es sabido que las miocarditis agudas presentan dos modalidades diferentes: miocarditis supurada y miocarditis difusa. Estas dos variedades suponen casi siempre la infección, pero de una manera desigual.

Las primeras se encuentran bajo la dependencia directa de los microbios piógenos. Las segundas, por el contrario, proceden de la acción de las toxinas y de los productos solubles segregados por los microorganismos patógenos.

Los microbios que hasta hoy han sido aislados en las miocardi-

tis supuradas, son:

El estreptococo piógeno;

El estafilococo piógeno áureo;

El bacilo del muermo;

El bacilo de la tuberculosis;

El gonococo.

Todos los microorganismos encontrados en las diferentes variedades de endocarditis infecciosas y de pericarditis podrán igualmente ser aislados en el pus de los abscesos del corazón consecutivos á estas endocarditis.

Arteritis. — Para el examen bacteriológico de estas afecciones es indispensable la coloración de los cortes. Al efecto se tomará entre dos ligadaras la porción de la arteria cuya sangre se ha recogido y se la fijará inmediatamente en el alcohol absoluto.

Las arteritis infecciosas son aún poco conocidas y estudiadas, no existiendo en la literatura médica sino un pequeño número de observaciones en que se haya practicado el examen bacteriológico de las arterias, y estos exámenes se han dirigido casi siempre sobre la aorta. Alguna vez se ha encontrado el bacilo de Eberth en la pared de las arterias de los tifoideos en el punto correspondiente á una trombosis por obliteración del tronco vascular. El bacilo se hallaba principalmente al nivel de la pared arterial y en el interior de los vasa-vasorum.

En la arteritis aguda se han encontrado alguna vez los estrepto-

cocos y los pneumococos. En el curso de una pneumonía se ha observado también aortitis vegetante debida al pneumococo.

Flebitis. — Para estudiar bacteriológicamente esta afección, se tomará sangre venosa con una pipeta después de cauterizar la pared venosa. Siendo indispensable en este caso la coloración de los cortes porque los microbios desaparecen de las paredes de las venas menos rápidamente que los coágulos, se tomará entre dos ligaduras la porción de la vena de la que se haya obtenido la sangre y se la fijará en el alcohol absoluto. Para obtener resultado se necesitan dos condiciones indispensables:

1.a Que la flebitis sea reciente;

2.ª Que las investigaciones se dirijan sobre varios puntos y principalmente sobre aquellos en los cuales se ha iniciado la enfermedad.

El estudio bacteriológico de las flebitis infecciosas deja mucho menos que desear que el de las arteritis infecciosas, pues las pri-

meras han sido objeto de numerosas investigaciones.

Estas flebitis aparecen como consecuencia de varias enfermedades. En la flebitis puerperal el agente patógeno es el estreptococo piógeno; en la fiebre tifoidea se encuentran flebitis producidas por micrococos en zoogleas y en cadenillas; en las trombosis venosas sobrevenidas en el curso de una pneumonía, se han encontrado

numerosos pneumococos.

Bacteriología del aparato respiratorio. Laringe. — Pocas investigaciones se han practicado sobre los microbios que existen en la superficie de la mucosa laringea en el estado normal. Casi lo mismo sucede cuando se trata del estado patológico de estos órganos; sólo se sabe que se ha aislado un estafilococo piógeno en ulceraciones recientes de la laringe de un tífico y que el bacilo de Eberth se ha encontrado también en estos casos.

En la tuberculosis laringea puede prestar grandes servicios la investigación del bacilo de Koch. Pueden presentarse dos casos:

1.º El enfermo atacado de laringitis tiene lesiones bronco-pulmonares con expectoración;

2.º La lesión es puramente laringea.

En el primer caso la auscultación y el examen de los esputos

permitirán apreciar si se trata ó no de un tuberculoso.

En el segundo caso puede procederse directamente al examen bacteriológico de los productos sospechosos tomados por medio de raspadura ó por medio de la pinza especial. En ausencia de síntomas pulmonares apreciables prestará grandes servicios el examen microbiológico de los productos de las ulceraciones, y sólo podrá rechazarse la hipótesis de tuberculosis en caso de resultado negativo, después de haber hecho gran número de preparaciones.

Estas investigaciones sobre el bacilo de Koch en los fragmentos recogidos por la pinza, pueden confirmar la naturaleza tuberculosa de los tumores que se observan en la tisis laringea de forma esclerósica ó vegetante y que muchas veces son de dificil diagnóstico.

En la tisis laríngea ordinaria, ulcerosa, se juntan con el bacilo de Koch, como en las cavernas pulmonares, los microbios ordinarios de la supuración y de las infecciones secundarias.

Bacteriología de los bronquios. — En el estado normal los alvéolos pulmonares no contienen microbios, pero las primeras vías aéreas sí los contienen. El estudio de los microbios en las vías respiratorias en el individuo sano, no ofrece gran interés, pues esta flora microbiana varía á cada momento, siendo probable que, además de los microbios del aire, inspirados á cada momento, existan en la superficie de las mucosas de las primeras vías aéreas, algunas especies autóctonas lo mismo que en el intestino.

La descripción de los microbios no patógenos, no ofrece pues interés alguno, y su presencia en el momento del examen bacteriológico depende de la mayor ó menor riqueza en gérmenes del aire en que se practica el ensayo. Por tener datos precisos sobre la flora microbiana en los bronquios de un individuo, será necesario que sólo respire aire estéril durante algunos días.

En cuanto á los bacilos patógenos, se han encontrado en los bronquios:

El bacilo piociánico;

El pneumo-bacilo de Friedlaender;

El bacilus sputigenes tenuis descubierto por Pansini.

También se han encontrado en el examen de las mucosidades bronquiales el estreptococo piógeno, el pneumococo y el estafilococo áureo.

La mayoría de los gérmenes del aire está compuesta de aerobios, siendo probable que estos gérmenes, situados sobre una pared revestida de una delgada capa de moco, se han englobado por ella y destruído por la acción bactericida de este moco. Pero de cualquier manera, es preciso no olvidar que existen en los bronquios y en el estado normal microbios patógenos.

Bronquitis. — El estudio bacteriológico de las bronquitis se hace por el examen de los esputos y en la autopsia por el de la mucosa bronquial. Los esputos de la bronquitis contienen siempre una cantidad considerable de microbios, cualquiera que sea la naturaleza de esta enfermedad. Estas especies son muy variadas, pero pueden reducirse todas ellas al pneumococo y al estreptococo.

Existe una serie de bronquitis, en las cuales se puede referir la causa á un agente patógeno bien determinado. Así es que las manifestaciones bronquiales de la erisipela son debidas al estreptococo piógeno; las del muermo al bacillus mallei, las de la grippe al bacilo de Pfeiffer, etc.

Es verosimil que las bronquitis variólicas y rubeólicas proceden del agente patógeno, desconocido aún, de estas fiebres eruptivas.

Bronco-pneumonía. — El primer examen bacteriológico completo

de bronco-pneumonías es debido á Darier, que en cuatro casos de bronco-pneumonía diftérica ha aislado el estreptococo piógeno en todos ellos. También se han encontrado estreptococos, bacilos de Friedlaender y estafilococos. Comúnmente el foco bronco-pneumónico sólo contiene una especie de las enumeradas.

Pneumonia. — Tratándose de individuos vivos, debe practicarse el examen del jugo pneumónico obtenido por picadura de las partes hepatizadas con la jeringa de Pravaz, como también el examen

de los esputos y de la sangre.

En la autopsia ha de buscarse el pneumococo inmediatamente después de la muerte. Por medio de una espátula de platino ó de cristal enrojecido se esteriliza una porción de la superficie del lóbulo hepatizado. Se hará salir por presión algunas gotas del jugo pulmonar, y se inyectarán á un ratón en la raiz de la cola. Es conveniente envolver el pulmón hepatizado en papel chupón empapado con sublimado, y después en una tela engomada cuando se le quiere transportar del anfiteatro al laboratorio.

Esputos pneumónicos. — Tómase con el hilo de platino una pequeña parte del esputo pneumónico, buscando con preferencia los más espesos; se le establecerá en una capa lo más delgada posible sobre una laminilla bien limpia y se le coloreará con el líquido de Ziehl.

Si existen pneumococos, se inoculará un pequeño fragmento del esputo, diluído en caldo, á un ratón; si éste muere, se buscará el pneumococo en la sangre del corazón donde se encuentra en cultivo puro, y con él se harán siembras sobre gelosa y en caldo.

Los esputos pneumónicos presentan casi siempre caracteres físicos muy marcados; son transparentes, adherentes al vaso y con una coloración color de orín ó de azúcar.

Desde el punto de vista bacteriológico contienen casí siempre el pneumococo, que se presenta en los esputos bajo la forma de pequeños granos alargados parecidos á una lámina de lanceta ó á una llama de bujia y cuyas extremidades apuntadas están frente á frente. Los elementos, dispuestos casi siempre de dos en dos, están rodeados por una especie de ganga, ó de cápsula coloreable por los reactivos. Una sola cápsula puede contener 2, 4 ó 6 elementos, formando una cadeneta corta y recta, en la cual cada uno de los elementos se prolonga según el eje de dicha cadeneta.

Es indispensable que las extremidades de estos elementos sean claramente lanceoladas para que se pueda afirmar la presencia del pneumococo en los esputos. Es preciso, además, que estos elementos existan en gran número, porque se encuentran los pneumococos en la saliva de gran número de individuos sanos y los esputos pueden contener algunas unidades sin que exista la pneumonía.

Existe además en los esputos de toda pneumonía un gran número de microorganismos de variedades y especies diferentes, como cocos, bastoncillos, etc.

El examen bacteriológico de los esputos pneumónicos prestará sobre todo grandes servicios en los casos en que los esputos no tienen caracteres microscópicos bien marcados. Este examen deberá practicarse cuando la pneumonía se hava desarrollado bien. que es cuando se tendrán más probabilidades de encontrar el pneumococo.

Examen de la sangre en la pneumonía. — Examinando la sangre de un enfermo pneumónico una hora antes de la muerte, se ha comprobado la existencia del diplococo pneumónico. La infección de la sangre se observa principalmente en los casos muy graves y que terminan por la muerte.

La investigación de los pneumococos en la sangre de los pneumónicos no da resultado generalmente, pues existen en ella en el estado de unidades aisladas. Hacia el 5.º ó 6.º día de enfermedad es cuando se tienen más probabilidades de encontrar el pneumococo, siendo muy difícil encontrarlo al principio de ella. Algunas pneumonías pueden llegar á la curación sin que en ninguno de sus periodos el examen de la sangre revele la presencia del pneumococo.

Complicaciones de la pneumonía. — Bajo el punto de vista bacteriológico, las complicaciones ó las lesiones extrapulmonares de la pneumonía, proceden de dos órdenes de causas; del pneumococo v de otros microbios.

En el primer caso son atacados más ó menos frecuentemente la pleura, el pericardio, el endocardio, las meninges, el oido medio, el peritoneo, los riñones, las parótidas y las articulaciones. Menciona. remos especialmente los abscesos subcutáneos producidos por los pneumococos á consecuencia de las invecciones de cafeina.

El pneumococo puede aún causar accidentes graves por complicación intrapulmonar, siendo causa del edema del pulmón que con frecuencia complica ciertas pulmonías y produce la muerte. En el pulmón atacado de edema se ha encontrado el pneumococo en el exudado de los alvéolos; los capilares pulmonares sólo los contie-

nen en el caso de pioemia.

Las infecciones secundarias provocadas por los microbios piógenos pueden determinar también complicaciones á consecuencia de una pneumonía. En este caso son los estafilococos y estreptococos los que pueden aislarse más fácilmente. Por último la pneumonía puede complicarse con varias enfermedades infecciosas, como fiebre tifoidea, grippe, etc., en cuyo caso se encuentra siempre el pneumococo.

Tuberculosis pulmonar. — Es sabido que, según su modo de evolución, puede ser aguda ó crónica, y en ambos casos las lesiones que se observan son debidas á la presencia del bacilo de Koch en el parénquima pulmonar. Examinaremos rápidamente la topografia de este bacilo en sus diferentes formas.

Tuberculosis aguda. - Puede evolucionar por dos modalidades diferentes: la tisis aguda granular y la pneumonía caseosa.