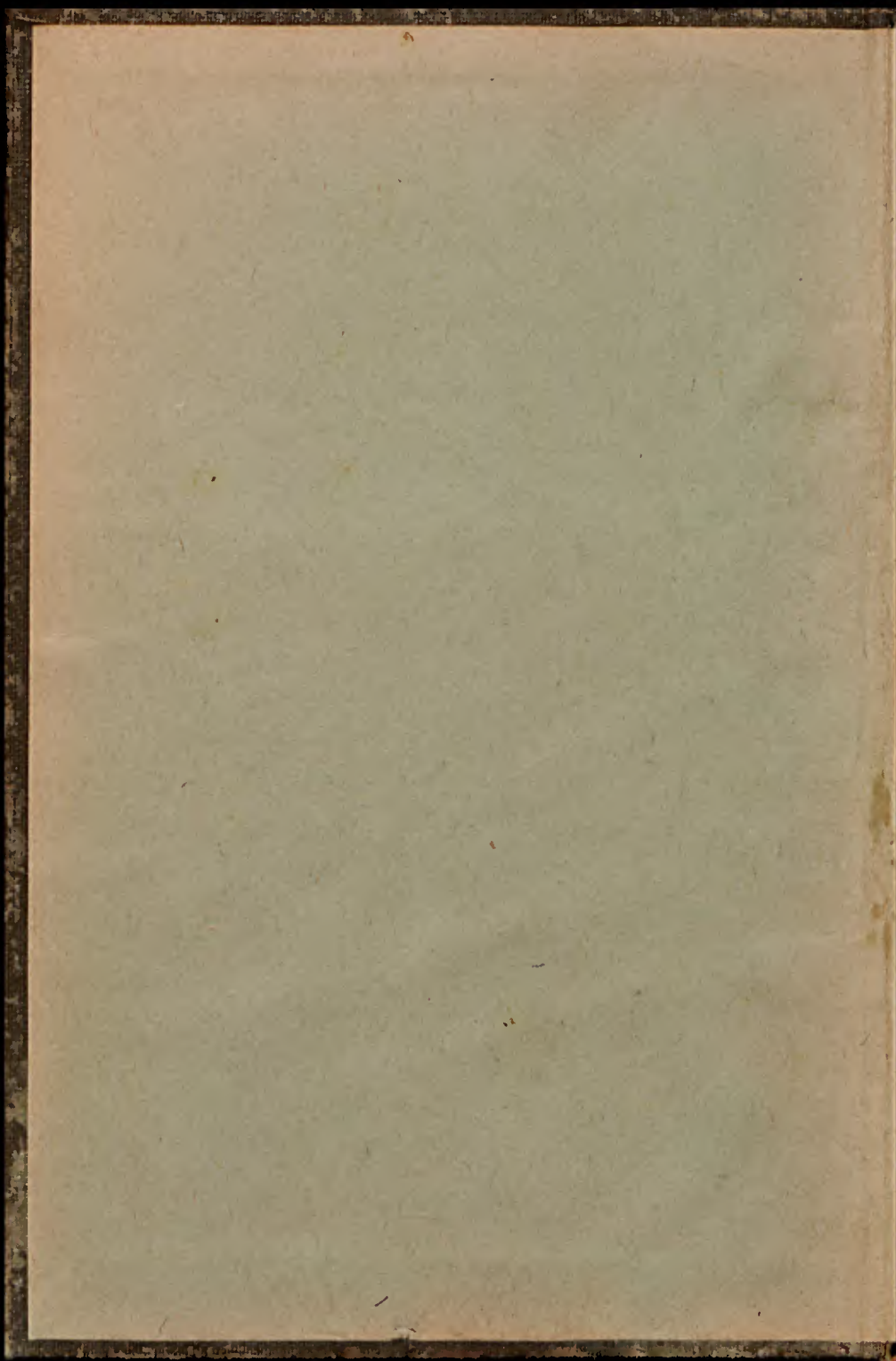


DR. RUDOLF ABEL
MANUAL
DE
TÉCNICA BACTERIOLÓGICA





372

R. 2.90
5.890

28
us,

n.º de ordem

1.019



BIBLIOTÉCA

N.º *1373*

Data 19

Estação Experimental Botucatu

BOTUCATU - Estado de São Paulo - Brasil



MANUAL
DE
TÉCNICA BACTERIOLÓGICA





Manual de Técnica

Bacteriológica

CONTIENE LAS PRESCRIPCIONES TÉCNICAS
MÁS IMPORTANTES PARA EL TRABAJO EN
LOS LABORATORIOS DE BACTERIOLOGÍA
— POR EL

Dr. Rudolf Abel

CONSEJERO MÉDICO PRIVADO Y PROFESOR
DE HIGIENE, EN LA UNIVERSIDAD DE JENA

2.ª EDICIÓN ESPAÑOLA, TRADUCIDA DE LA
— 22.ª ALEMANA, POR EL

Dr. Enrique Moles

PROFESOR DE LA UNIVERSIDAD CENTRAL
CON UN PRÓLOGO **R. TURRÓ**
DEL PROFESOR
DIRECTOR DEL LABORATORIO MICROBIOLÓ-
— GICO MUNICIPAL DE BARCELONA



— BARCELONA
MANUEL MARÍN, EDITOR
Provenza, 273 — 1920

Manual de Bacteriología

Es propiedad. Derechos reservados.
Queda hecho el depósito que marca la
Ley.

Imprenta de Domingo Clarasó, Villarroel, 17.—Barcelona.



ADVERTENCIA DEL TRADUCTOR

En el intervalo de la publicación de la 1.^a y 2.^a ediciones españolas han aparecido hasta 11 ediciones alemanas, en cada una de las cuales el autor ha introducido correcciones y modificaciones de mayor o menor importancia que ponían el «Manual» al corriente de los últimos adelantos. Por esta razón, la nueva edición española, aun cuando conserva el mismo aspecto y volumen igual que la anterior, contiene tal número de modificaciones y adiciones, que merece realmente el calificativo de «nueva».

Para dar una idea de la importancia de aquéllas citaremos entre los párrafos o capítulos *completamente* nuevos, los referentes al ultramicroscopio y al método Burri o de la tinta china, los de los bacilos de la intoxicación por la carne, de la septicemia hemorrágica, del mal rojo del cerdo, del edema maligno, de la gangrena gaseosa, de la necrosis; la exposición verdaderamente magistral de la suerorreacción en la sífilis (reacción Wassermann), los cuadros comparativos de las propiedades del b. tífico y sus análogos, etcétera.

Profundamente modificados están los capítulos correspondientes a la coloración de esporas y cápsulas y los de los bacilos de la tuberculosis, difteria, tifus, disentería, cólera, gonococos, tétanos, meningococos, malaria, sífilis y el referente a análisis de aguas.



Modificaciones de mayor o menor importancia existen en *todos* los demás capítulos sin excepción. Todo ello, unido al criterio rectilíneo del autor; de aceptar únicamente métodos de reconocido éxito y fácilmente practicables, creemos que es motivo suficiente para excusarnos un elogio ditirámico de la obra ya que el lector sabrá apreciar más la realidad, que el manejo más o menos justificado de los adjetivos.



PRÓLOGO

DE LA 22.^a EDICIÓN ALEMANA

La edición 21.^a de esta obra sufrió pocas variaciones, ya que en la 20.^a se habían hecho considerables correcciones y adiciones, variando totalmente varios de sus capítulos. No obstante, se redactaron de nuevo muchos párrafos poniéndolos al día, por ejemplo, en los capítulos referentes a la difteria, tífus, gangrena gaseosa, malaria y análisis de aguas. Por esta razón en la edición presente publicada antes de haber transcurrido un año de la aparición de la anterior, las variaciones han sido pequeñas.

Respondiendo a deseos repetidamente manifestados por la crítica, hemos de hacer constar una vez más que el presente «Manual» constituye únicamente un auxiliar técnico, sin que en modo alguno pretenda llegar a la categoría de tratado de bacteriología y por lo mismo, resultan inevitables ciertas limitaciones en lo que respecta a su extensión. Por esta misma razón, tampoco han sido tenidas en cuenta ciertas cuestiones de interés circunstancial, en relación con la pasada guerra, tales como, por ejemplo, lo referente a sustitutos para los medios de cultivo al aprovechamiento de éstos últimos, al diagnóstico de la fiebre y la enfermedad de *Weil*.

Las ideas directrices y la distribución de las materias siguen siendo las ya acreditadas de antiguo. Por



lo tanto, sólo aceptamos de entre los procedimientos nuevos aquellos cuya bondad ha sido confirmada por la práctica. Además, seguimos prescindiendo de aquellos métodos que no resultan apropiados para ser enseñados y aprendidos en los cursos corrientes, o aquellos que únicamente sean practicables en laboratorios espléndidamente instalados. No obstante, se mencionan o se dan las cotas bibliográficas suficientes para que se tenga noticia de los métodos nuevos notables, no comprobados suficientemente, así como de aquellos que son complicados en exceso. Además, en todos los métodos nuevos aceptados, damos la correspondiente cota bibliográfica para que pueda consultarse el trabajo original en caso necesario.

A los principiantes que deseen practicar un método cualquiera de análisis, les recomendamos que lean siempre antes, los párrafos correspondientes al mismo, para evitar de este modo que puedan cometer errores debidos a la no observancia de prescripciones o reglas generales o especiales.

La pequeña monografía de R. Abel y M. Ficker: «Ueber einfache Hilfsmittel zur Ausführung bakteriologischer Untersuchungen» (Wurzburg, C. Kabitsch), 1908, 2.^a edición, contiene una serie de indicaciones respecto al modo de ejecutar trabajos de laboratorio con los medios más elementales, que pueden ser igualmente útiles para el caso de investigaciones bacteriológicas en campaña.

Ojalá goce la nueva edición de la misma favorable acogida que las precedentes.

Jena, Mayo de 1919.

DR. RUDOLF ABEL



PRÓLOGO

Una ciencia como la Bacteriología, nacida ayer y hoy ya con vida tan robusta y espléndida, forzosamente ha de ser objeto de una renovación incesante. Durante su período constitutivo, que abarca poco más de un cuarto de siglo, los trabajos que se han acumulado y los descubrimientos que se han sucedido unos a otros de una manera incesante, no han permitido todavía formar un cuerpo de doctrina, libre del vaivén de las rectificaciones, sólido y estable, como ocurre con las ciencias ya definitivamente constituídas. Dentro un plan general, desdibujado todavía en sus líneas más fundamentales, hay en esta ciencia contemporánea, materiales hacinados, incoherentes y vagos que no ocupan el lugar en que con el tiempo serán emplazados, ni son interpretados desde puntos de vista teóricos que nos lo expliquen de una manera seriada y fácil, mostrando las conexiones que entre sí los unen. Vendrá un día, que ya apunta, en que ese conjunto de hechos serán reducidos a leyes, a mecanismos, a teorías, a modos de sucederse en el espacio, de suerte que poda-



mos predecir *cómo aparecen y cuándo aparecen*, como ha ocurrido con la Física y con la Química y como está ocurriendo actualmente con la Fisiología; entonces será cuando la Bacteriología habrá adquirido el rango de ciencia constituida con procedimientos técnicos simplificados y de resultados seguros. En otro sitio hemos comparado el paso del período constituyente de una ciencia al estadio constituido, al de las aguas madres que sólo precipitan cuando están sobresaturadas y permanecen en reposo.

Bien se comprende que todas las obras en que tantos progresos se compendian, han de adolecer de dos defectos capitales, por grande que sea el talento y la buena voluntad del Autor. Es el primero, sobrecargar la memoria del lector con la exposición de procedimientos de investigación que están a punto de caer en desuso, por haberse substituído con otros más ventajosos, sencillos y prácticos. El progreso de los tiempos va demostrando paulatinamente que esa erudición sólo tiene un interés histórico, muy secundario para la ciencia, y poco a poco van cayendo en las simas del olvido nombres de sabios, sin cuya labor previa, compleja e insegura, no se habría conseguido la simplificación ulterior.

Compárense, por ejemplo, en apoyo de este aserto, los métodos de coloración que en los tratados del quinquenio de 1885 a 1890 se exponían, con los que ahora se aconsejan, o bien, los procedimientos instituídos entonces y ahora respecto del cultivo de las especies anaerobias y hasta respecto del concepto que la naturaleza de estas especies nos merecen después de los trabajos de Rosenthal, y se reconocerá hasta que punto se ha expurgado la ciencia de lo que, cruel y desdeñosamente, consideramos ahora como broza inútil. ¡Y son tantas las materias en que se ha procedido y se sigue implacablemente procediendo de la misma manera!...



La ciencia, a medida que se desarrolla y avanza, es un Minotauro: devora a sus propios hijos.

El segundo, inconveniente de que adolecen las obras que dentro ese período de renovación se publican, consiste en su envejecimiento prematuro. El descubrimiento, por ejemplo, del microbio de la sífilis o el de la coqueluche, basta para que sean estimadas como malas, o cuando menos como deficientes, obras que poco antes eran buenas y asaz completas.

Estos males son en gran parte irremediables. Hasta tanto, que se agotó la edición vieja, el editor no piensa en imprimir la nueva atento a su interés mercantil, y es natural que así suceda; de aquí que el que compra *la última edición*, se encuentra en un gran número de cuestiones con que se entera de antigüallas que ni vienen actualmente al caso, ni le importa conocer, ni serán reproducidas siquiera en *la nueva*.

En Alemania, donde la vida científica es tan intensa, se han corregido hasta cierto punto estos inconvenientes por medio de los *Anuarios*, en los que se recopila lo más saliente de lo publicado; mas, el que labora prácticamente y aprende de verdad la Bacteriología, necesita un texto fácil, conciso y claro, en que se le den en forma condensada y breve los procedimientos de investigación, que debe usar como los más conducentes al esclarecimiento del fin que se propone. Los *Anuarios* son buenos para los maestros o los profesionales por ser obras complementarias; pero no lo son de la misma manera para los alumnos que siempre deben aplicar lo último y lo más reciente, que suele ser siempre lo más sencillo y fácil.

Abel, Profesor notabilísimo y hábil técnico, ha zanjado la dificultad sacando a luz, cada vez que abre el curso, una nueva edición de su texto, remozado con lo más saliente que se ha publicado en el año finido y expurgado de redundancias. Es una obrilla al parecer



reducidísima y elemental, pero tan nutrida, que, de no hacerse omisión de algunos procedimientos de investigación franceses, que estimamos insuperables, de ella podría decirse sin exageración que es una obra perfecta en el momento actual. La preparación de los variadísimos medios de cultivo, los datos necesarios para esclarecer un diagnóstico y reconocer las especies bacterianas, la apuntación de las cuestiones más trascendentes que se agitan en las altas esferas de la ciencia, los métodos de exploración para el reconocimiento de las bacterias de las aguas y, en suma, cuanto en ella se expone en párrafos prietos y jugosos, reviste un interés práctico o de aplicación inmediata. Es un *Manual* utilísimo, que a cada momento hay que consultar en el laboratorio por hallarse en sus páginas, bajo una forma brevísima, cuanto de viejo ha llegado a sedimentarse en la ciencia por su intrínseca bondad y cuanto de nuevo pueda facilitar la labor del investigador.

El Dr. Moles ha tenido una excelente idea al vertir esta obra al español, porque, realmente, su texto, con ser tan corto, es exuberante por lo viejo y lo nuevo que contiene; y además, por insinuarnos en esta buena costumbre, que ojalá llegase a implantarse en nuestra patria, ya que con ella se vería claramente cuántas cosas inútiles se enseñan y cuántas provechosas dejan de enseñarse por andar rezagados con las viejas ediciones. Ciertamente que en el estado en que nos hallamos no cabe esperar que la edición se agote anualmente como ocurre en Alemania: pero no lo es menos que por ahí debe empezarse; para que a la juventud estudiosa no le suenen como nuevas, doctrinas que declinan o procedimientos técnicos defectuosos o inciertos.

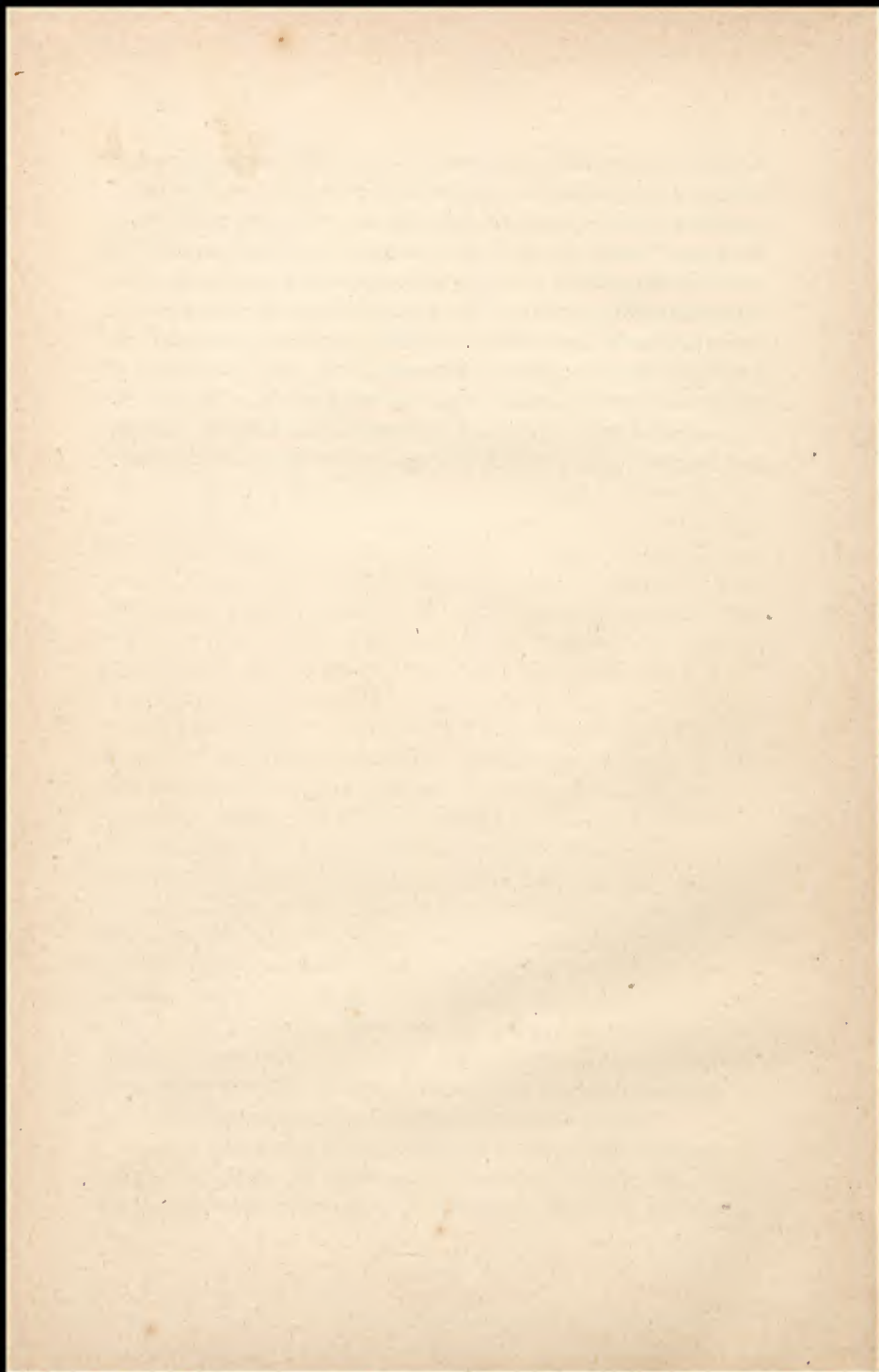
La traducción del Dr. Moles es concienzuda, apropiada y veraz en todas sus partes. Allí en donde el concepto está como empotrado en la palabra alemana,



siempre tan repleta, cediendo a la natural expansión de la lengua española, lo ha infundido en los moldes más amplios de ésta, conservándolo con respeto religioso. Aun así, habituados como estamos a dejar correr la palabra sin cuidar de que sea trasunto exacto del pensamiento, hay momentos en que uno se siente tentado a reprocharle por excesivamente conciso; pero el lenguaje de la ciencia es austero y frío, como austera y fría es la verdad árida a que se adapta; la claridad es su cualidad más excelsa y la traducción del Dr. Moles es tan clara que resulta transparente como un cristal.

R. TURRÓ





CONTENIDO DE LA OBRA

	<u>Págs.</u>
Advertencia del traductor	V
PRÓLOGO	VII
Contenido de la obra	IX
I. <i>El microscopio</i>	1
II. <i>Esterilización y desinfección</i>	9
III. <i>Medios de cultivo</i> . Generalidades	13
IV. <i>Métodos de cultivo</i> . Generalidades	31
V. <i>Métodos de coloración</i> . Generalidades	54
VI. <i>Métodos especiales de investigación</i>	83
B. del carbunco	83
B. de la tuberculosis	85
B. del esmegma	94
B. de la lepra	95
B. del muermo	96
B. del chancro blando	98
B. de la difteria	99
B. de la influenza	104
B. del tifus (y paratíficos)	105
B. coli	122
B. de la intoxicación por la carne	122
B. de la disentería	124
Vibraciones del cólera	126
B. de la peste bubónica	132
B. de la septicemia hemorrágica	133
B. del mal rojo del cerdo	133
B. piocianeo	134



	<u>Págs.</u>
B. del tétanos	134
B. de la gangrena gaseosa, del edema maligno, Chauvoei y de la necrosis	135
Estreptococos y estafilococos piogenos	137
Neumococos y neumobacilos	239
Meningococos	140
Gonococos	141
Actinomicas	143
Levaduras y aftas	144
Mohos y otros hongos	145
Amibas	147
Parásitos de la malaria	149
Tripanosomas	152
Espiroquetas de la sífilis	153
Espiroquetas de la fiebre recurrente	163
Corpúsculos de la rabia canina	164
VII. <i>Modo de recoger el material analizable del cuerpo animal</i>	166
VIII. <i>Inoculaciones y autopsias:</i>	
Inoculaciones	171
Autopsias	177
IX. <i>Análisis bacteriológico de:</i>	
El agua	181
El aire	186
El suelo	187
X. <i>Modo de conservar las preparaciones, cultivos y órganos animales</i>	189
Tabla resumen de los caracteres de los b. del tifus-coli-disentería	194
Abreviaturas de la bibliografía	197
INDICE	199



MANUAL DE TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

I

El microscopio

En los trabajos de Bacteriología, se emplean las lentes en seco para orientarse en las preparaciones microscópicas y para observar las colonias bacterianas.

Para el examen de las bacterias en especial, se usan las lentes de inmersión.

Cuando se emplean estas últimas, se coloca sobre la superficie limpia (modo de limpiar, v. pág. 7) del cubreobjetos (los más usados son los de forma cuadrática, de 18 mm. de lado y 0,16 mm. de espesor) mediante una varilla de vidrio, una gota del líquido de inmersión (aceite de cedro espeso, no el empleado para aclarar cortes de tejidos, muy fluido) y se baja el tubo del microscopio hasta que la lente del objetivo esté en contacto con el líquido de inmersión. Entonces se mira por el ocular y se baja de nuevo el tubo con la mano o mediante el tornillo grande de cremallera (cuando éste existe en el aparato) hasta que se observe una imagen confusa del objeto, después de lo cual, se busca la posición exacta moviendo con cuidado el tornillo micrométrico.

Las bacterias se examinan en *a*) preparaciones sin colorear, y en *b*) preparaciones coloreadas.

1.—TÉC. BACTER.



a) *Preparaciones sin colorear.* Sirven para el estudio de los microorganismos en vivo y se preparan bajo la forma de las llamadas *gotas suspendidas* (v. en la pág. 6 los métodos ultramicroscópico y el de la tinta china).

Mediante una öse (1) de platino previamente enrojecida, se coloca en el centro de un cubreobjetos perfectamente *limpio* (v. pág. 8) sostenido en el borde de la platina del microscopio o con una pinza de Cornet, una gota de solución fisiológica (0,85 %) de ClNa esterilizada (o también caldo o agua de peptona, v. págs. 13, 17 y 22), a la que se añade un indicio (no demasiado) del material bacteriano, con una aguja de platino; cuando se trata de observar un líquido poco abundante en bacterias, se pone directamente una gota de éste, sin diluirlo, sobre el cubreobjetos. Luego se coloca el cubreobjetos invertido sobre un portaobjetos con una concavidad cuyos bordes se untan de vaselina, de modo que la gota quede libre en el centro de la concavidad. Se comprimen los bordes del cubreobjetos para que quede sujeto a la vaselina, quedando así la gota en un espacio cerrado herméticamente. En caso de no obtener un cierre perfecto, la evaporación de la gota producirá corrientes que, arrastrando las bacterias, puedan cambiar fácilmente el movimiento de éstas, y conservando la preparación largo tiempo, la gota se seca. (Las preparaciones en *gota suspendida* tienen la ventaja sobre las preparaciones ordinarias, extendidas entre el cubre y el portaobjetos, de que la gota encerrada herméticamente en la concavidad, no puede evaporarse y no puede,

(1) Con la palabra öse designan los bacteriólogos alemanes un instrumento constituido por un hilo de platino de 8-10 cm. de largo doblado por un extremo en forma de anilla y fijo por el otro en una varilla de vidrio. Hemos adoptado en esta traducción la palabra original, porque está generalizada ya y aceptada en las obras de bacteriología, además de que no existe el equivalente en español. (N. DEL T.)

por lo tanto, mojar ni contaminar las manos ni los instrumentos.)

Para *observar la gota suspendida* se coloca ésta usando diafragma estrecho y objetivo de poco aumento, de modo que el borde quede próximamente en el centro del campo de visión. Sustituyendo luego el objetivo por la lente de inmersión, debe quedar el borde de la gota en la misma posición, en el centro del campo visual, suponiendo que las lentes del objetivo están centradas idénticamente, como ocurre siempre, por lo cual puede reconocerse con facilidad dicho borde. Se pone una gota de aceite de cedro sobre el cubreobjetos (sin mover la preparación) y se toma diafragma más ancho (referencia a éste, véase pág. 5 «Iluminación»). Luego se baja el tubo del microscopio hasta que la lente frontal del objetivo esté en contacto con el aceite y se continúa bajando con el mayor cuidado, observando al mismo tiempo por el ocular, primero con el tornillo grande, y finalmente con el micrométrico, hasta que el borde de la gota aparezca bien definido. Es muy conveniente mover el portaobjetos con la mano durante la observación dándole un ligero movimiento de vaivén; así puede notarse si la lente ha descendido demasiado y comprime el cubreobjetos, con peligro de romperlo; además, el borde de la gota (que aparecía como una sombra en la primitiva colocación) se notará mucho más fácilmente moviéndolo que estando fijo. Hacia la parte externa del borde de la gota se observa una especie de malla fina (precipitados debidos al vapor de agua en la cara inferior del cubreobjetos y alrededor de la gota). Los prácticos observan en seguida la gota con lente de inmersión. Los principiantes pueden adicionar un indicio de solución de fuchina para reconocer con mayor facilidad la imagen en el microscopio; la pequeña cantidad de materia colorante no



daña a las bacterias. Se observa el borde de la gota porque su contorno es más fácil de ver que el interior de la misma. Las *bacterias que se mueven* se reúnen rápidamente en el borde, a causa de que allí hay mayor contacto del aire con el líquido. Para preparar la gota no debe emplearse nunca agua destilada, porque ésta perjudica frecuentemente los movimientos de los microorganismos. Al examinar cultivos recién salidos de la estufa, se emplea líquido templado para evitar que la frialdad entorpezca los movimientos de las bacterias, apareciendo éstas inmóviles. Debe evitarse el confundir el movimiento molecular Browniano (oscilante, trémulo) con la verdadera movilidad (cambios de lugar en el campo visual, etc.) La gota debe estar *lo más extendida que sea posible*, para que pueda observarse en todas sus partes con la lente de inmersión (en las gotas mayores quedan fuera del foco de la lente de inmersión las partes de mayor espesor de aquéllas).

Esterilizando el cubreobjetos a la llama y preparando la gota con un medio de cultivo transparente, líquido o hecho líquido, se obtiene un *aparato de cultivo*, en el cual puede observarse mediante el microscopio el desarrollo de las bacterias, pudiendo usar en caso necesario una platina especial que puede calentarse (v. además cap. X).

Después de hecha la *observación*, se separa el *cubre* del portaobjetos procurando que la gota no toque este último. Esto se consigue corriendo el cubre hacia el borde del porta y levantándolo con unas pinzas de teñir; es siempre preferible colocar el cubre con sus bordes paralelos a los del portaobjetos. Para matar las bacterias se dejan los cubres en ácido sulfúrico. El portaobjetos puede utilizarse en seguida para una nueva preparación sin más que completar el anillo de vaselina, o bien se quita ésta con un poco



de papel de filtro y se limpia con un paño humedecido en bencina.

b) Para la obtención de *preparaciones coloreadas, de frotos y cortes* (v. págs. 54 y sigs.).

Iluminación de la imagen microscópica

En la *observación* de las *gotas suspendidas*, se emplea el espejo cóncavo y diafragma estrecho (o la posición cerrada del diafragma iris) para resolver los contornos y detalles de la imagen. Cuanto más potente es el objetivo, tanto más ancho debe ser el diafragma; para la lente de inmersión se toma la mitad menor. El aparato de iluminación (condensador) de Abbé, queda eliminado con el empleo del diafragma, de modo que no es necesario separarlo.

Para *observar preparaciones teñidas*, se emplea el espejo plano, sin diafragma, para resolver una imagen de absorción o teñida. Entonces entra en funciones el **aparato condensador de Abbé** que debe disponerse de modo que la imagen del foco luminoso por él reflejada, caiga precisamente en el lugar de la preparación que quiera observarse. Teniendo el espejo en posición conveniente, se mueve el tubo del microscopio hasta obtener con un objetivo de poco aumento, una imagen perfecta de la preparación. Luego se dirige el espejo plano a un objeto apartado (p. ej. un árbol, una casa) y se sube o baja el aparato condensador, sin mover nuevamente el tubo, hasta conseguir que en él aparezcan simultáneamente la imagen de la preparación y otra imagen perfecta del objeto reflejado por el espejo. Se deja el aparato condensador en esta posición y el espejo se dirige ahora a otro objeto luminoso muy distante, p. ej.



una nube blanca, que no debe dar imagen propia perturbadora. (La colocación exacta del condensador de Abbé hecha del modo antes descrito, no es siempre necesaria; basta, por regla general, colocar el condensador lo más arriba posible, cuando se trata de un foco luminoso lejano, y algo más abajo cuando se trata de un foco cercano, para obtener con él los mejores resultados. — Cuando la iluminación es mala, debe colocársele exactamente.) La luz muy viva de las nubes blancas, se amortigua interponiendo en el aparato diafragmático del microscopio un disco de vidrio azul claro o colocando cortinas en las ventanas, etc.

El *foco luminoso artificial* más apropiado, es la lámpara eléctrica (empleando bombillas de cristal mate) o la luz incandescente de gas. También puede utilizarse una lámpara de petróleo, interponiendo un disco de vidrio azul en el diafragma del microscopio, o haciendo pasar la luz por una esfera de vidrio o un matraz, lleno de solución de sulfato de cobre amoniacal. (Solución de 0,25-0,50 gr. de sulfato de cobre en 1000 de agua, a la que se añade 10 cc. o más de amoníaco al 25 % hasta que la imagen aparezca perfectamente blanca. La boca de la vasija debe cerrarse con un corcho.) Si empleando focos luminosos próximos, la imagen de éstos estorba en la observación de las preparaciones, se usa también el espejo cóncavo para las preparaciones teñidas; o bien se mueve un poco el aparato de Abbé, hasta colocar exactamente la imagen del foco luminoso.

La llamada *iluminación en campo oscuro* (disposición especial del microscopio, ultramicroscopia), permite ver iluminados sobre un fondo oscuro, cuerpos pequeñísimos; se emplea p. ej., para observar la espiroqueta de la sífilis en vivo, y también los cirros de bacterias vivas. Para ello se utilizan condensado-



res de espejo (de Reichert, Leitz) o el condensador paraboloide de Zeiss; como foco luminoso que en este caso ha de ser muy intenso, se emplea una lámpara Nenst o un pequeño arco de carbón. Los porta y cubreobjetos usados son de modelo especial.

También aparecen brillantes sobre fondo negro las bacterias etc. colocadas en gotas de tinta china por el método de Burri (pág. 39).

Modo de limpiar el microscopio

Cuando se quiere separar del microscopio una preparación observada con inmersión, se sube primero el tubo de aquél para evitar que la lente frontal del objetivo, pueda rayarse al quitar bruscamente el portaobjetos.

Después de trabajar en el microscopio, se separa el líquido de inmersión de la lente mediante papel de filtro fino. Luego se enjuga con un trozo de piel o una gamuza limpia. Si la lente está manchada con aceite resinoso, bálsamo del Canadá o líquidos parecidos, puede limpiarse (al igual que los demás lentes) por medio de una gamuza o papel de filtro fino, humedecido en xilol, bencina, etc. Debe tenerse mucho cuidado en no prolongar el contacto con estos líquidos, que pueden disolver los engastes de las lentes.

El microscopio después de usarlo se resguarda de la luz y del polvo, cubriéndolo con una campana de cristal ennegrecido, o con una caja de cartón, o se guarda en la caja propia. Si no se quita el objetivo del microscopio, debe colocarse un poco de papel de filtro fino y limpio, entre aquél y el condensador de Abbé, para evitar un contacto inmediato entre ambos.



Conservación de las preparaciones

Véase págs. 57, 63.

Modo de limpiar los cubreobjetos

Los *nuevos*, deben limpiarse con una mezcla de alcohol y éter, ^{aa} o con xilol y bencina y luego con un lienzo fino o con papel delgado de filtro. Una gotita de agua colocada en su superficie, debe extenderse regularmente en todas direcciones; si no sucede así se han de repetir los anteriores tratamientos. Facilita muchas veces la limpieza y aun basta frecuentemente por sí el calentar los cubreobjetos colocados unos junto otros sobre una plancha metálica.

2. *Cubreobjetos usados*, a). Después de terminadas las observaciones, se ponen las laminillas en un vaso con ácido sulfúrico ordinario, se pasan luego, junto con el ácido, a una cápsula ancha de porcelana; para limpiarlas se lavan repetidas veces con agua para separar el ácido y se hierven en una lejía fuerte de potasa o carbonato potásico, se lavan de nuevo con agua y luego se enjuagan con alcohol, etc., como las nuevas b). Según Zetnow: 1. Se hierven los cubreobjetos durante 10 minutos y agitando, en la solución siguiente: 200 grs. de dicromato potásico disueltos en 2 litros de agua hirviendo + 200 cc. de ácido sulfúrico ordinario. 2. Separarlos del líquido, lavarlos 5 minutos en lejía diluída de sosa. Repetir ambos tratamientos (el 1. sólo 5 minutos). Lavar con agua, alcohol, secarlos.



II

Esterilización y desinfección

Todas las vasijas y medios nutritivos que quieran destinarse al cultivo de microorganismos, deben estar desprovistos de gérmenes; de lo contrario también éstos se desarrollarían y darían lugar a contaminaciones y errores.

Hay que atenerse a las siguientes reglas generales:

1. Los objetos más pequeños, como agujas de platino, cuchillas, tijeras, pinzas, varillas de vidrio, pueden esterilizarse a la llama. Los objetos de platino se calientan al rojo vivo, los restantes no se calientan al rojo, sólo se pone en contacto de la llama un par de segundos, por lo menos, la parte que haya tocado material bacteriano. Los instrumentos metálicos se embotan y empañan por la calefacción, por esto es preferible esterilizarlos según los núms. 2-3. Solamente los instrumentos de platiniridio (muy caros) quedan afilados a pesar de enrojecerlos frecuentemente (propios para siembras de cultivos duros y tenaces—*antinomices*, hongos—también para sangrías,—v. cap. VII). Las placas de vidrio, tubos de ensayo (hasta que el tapón de guata empieza a ponerse pardo) las cápsulas de vidrio, pipetas, jeringas (cuando ninguna de sus partes puede ser destruída por el fuego), pueden también ser esterilizadas a la llama.



2. Todos los objetos mayores pueden someterse a la acción del calor seco.—Los objetos de cristal, los metálicos (los que tengan soldaduras, no), la guata y papel de filtro, se esterilizan en el horno, durante $\frac{1}{2}$ hora, a 150° o más. La guata no puede calentarse a más de 180° , porque se vuelve parda y quebradiza y lo mismo ocurre con el papel de filtro, que se carboniza. Los objetos de vidrio y de metal, pueden calentarse a 200° y aun más.

3. Los objetos que no pueden soportar el calor seco, pero que no se alteran por la ebullición, se esterilizan al calor húmedo o sea en corriente de vapor. Tales son los objetos de goma, los líquidos y los medios de cultivo, a excepción de los que contienen albúmina coagulable. Para la mayor parte de los casos, basta la permanencia en la corriente de vapor de 100° , de 15-30 minutos. Los líquidos en grandes cantidades, han de sufrir la acción más prolongada (1 hora) que los en pequeñas cantidades, porque tardan más tiempo en calentarse a 100° . Así pues los matraces de litro, llenos de líquido, han de permanecer más tiempo que los tubos de ensayo. Si los materiales nutritivos contienen esporas aptas para reproducirse, se siguen dos procedimientos para la esterilización: se les somete tres días consecutivos a la acción del vapor durante 15-60 min. y en los períodos intermedios se mantienen a unos 20° o también a 37° (se espera a que las esporas germinen y así, las formas vegetativas resultantes pueden matarse por la calefacción siguiente) o bien se esteriliza en el autoclave a temperaturas hasta 130° y las correspondientes presiones (tiene la ventaja de que no deben emplearse varios días en la esterilización completa; sin embargo, no puede emplearse en la gelatina, p. ej., por perjudicarla en su punto de solidificación, para la leche porque toma color pardo). Una temperatura de 120° , debe actuar



durante 10-15 minutos, para destruir todos los gérmenes, una temperatura de 130°, 1 minuto.

Los instrumentos destinados a usos quirúrgicos, se esterilizan hirviéndolos durante 15 minutos en una solución de carbonato sódico al 1-5 % (es apropiado para ello el aparato de Schimmelbusch).

4. Objetos que no pueden soportar sin transformaciones ni el calor seco, ni la acción del vapor (suero, albúmina de huevo, etc.)

a) Recogerlos estériles (véase suero sanguíneo, página 23).

b) O someterlos a una *esterilización fraccionada* a unos 56-60°, cada día 1-4 horas y durante varios días sucesivos (hasta 8) y en los períodos intermedios, se mantienen a 20° o a 37°. (Fundamento: véase antes número 3). Este método no da resultados seguros, puesto que para muchos organismos, la temperatura de 60° es casi la óptima para su desarrollo; además, no todas las esporas germinan en el intermedio de dos calefacciones o producen otras nuevas.

c) Se pueden filtrar las citadas substancias por un filtro Chamberland, Berkefeld, Pukall, Ysny, o mediante un filtro de asbesto, preparado según *Heim* (Ctrbl. f. Bakt. Ref. Tom. 38, p. 32), con ayuda de una trompa de agua, obteniéndolas *exentas de gérmenes*. Los líquidos albuminosos filtran muy difícilmente (calentándolos ligeramente pasan con más facilidad). Se puede emplear con ventaja este procedimiento, para separar los productos de transformación de las bacterias, de las bacterias vivas.

Véase más adelante lo referente a la esterilización del suero y análogos, pág. 26 y siguientes.

5. Un lavado o enjuague, en sol. de sublimado al 5‰ y luego en alcohol y éter aa, constituye un procedimiento de esterilización aplicable a muchos objetos (p. ej. objetos de goma), aunque positivamente



te, no tiene por sí solo influencia segura. Cuando sea esto posible, se queman en la llama los últimos restos de alcohol-éter.

6. Cuando se trata únicamente de matar las bacterias, p. ej., *para desinfectar los tubos de ensayo* usados, se emplea de preferencia una solución de sublimado al 1 : 1000, adicionada de 1 % de ClH o ClNa. Las vasijas destinadas a cultivos, usadas, pueden librarse de gérmenes patógenos vivos, hirviéndolas durante 1-2 horas, en una olla con agua o en corriente de vapor. Las *manos contaminadas* de bacterias, se limpian lavándolas perfectamente con solución de sublimado al 1 : 1000 o con ácido fénico al 1 : 100. Se lavan luego con agua, jabón y cepillo; otra vez con solución desinfectante reciente y otra vez con agua. N. B. La primer agua de loción y aun el cepillo, pueden en ciertos casos contener aun gérmenes, por esto conviene la nueva desinfección.—*Neutralización o destrucción de los cadáveres* de animales (v. cap. VIII).



III

Los medios de cultivo.—Generalidades

La base de los medios más usados para el cultivo de las bacterias es el

Agua de carne

1. 500 gr. de carne de ternera o de caballo, cortada en pequeños pedazos y desprovista de grasa, se ponen en maceración durante media hora, en una cazuela metálica con un litro de agua caliente a 50° y luego se hierve de 30-45 minutos (véase, además, página 18, epígrafe 1).

2. El caldo resultante se filtra o cuela para separarlo de la carne y se le añade agua hasta obtener 1 litro. Se echa en un matraz y se tapa con algodón en rama.

Con esta agua de carne se preparan: el *caldo*, la *gelatina* y el *agar*. En caso de que quiera conservarse, debe ser hervido durante tres días consecutivos en corriente de vapor durante media hora o bien una sola vez en la autoclave a 120° durante 15 minutos.



Caldo

1. Al agua de carne se le añade un 1 % de peptona (preferentemente Witte-Rostock o Chapoteaut-París, o preparada según Martín [*Ann. Past.* tom. 12, pág. 26]), o más, hasta un 5 %, y, además, $\frac{1}{2}$ % de sal común. Para el cultivo de muchas bacterias es útil añadir además 0,1-3 % de glucosa. (El azúcar debe añadirse al final de la preparación, puesto que por una ebullición prolongada se transformaría en caramelo que comunicaría al medio un color pardo; véase también pág. núm. 3. Lo más recomendable es añadir al caldo preparado convenientemente la cantidad necesaria de solución al 10 % de azúcar previamente esterilizada).

2. Hervir hasta que se hayan disuelto las sustancias añadidas.

3. Neutralizar con solución acuosa saturada (también puede usarse al 10 % o normal) de carbonato sódico (o también de fosfato sódico ácido) o lejía de NaOH al 25 %. El final de la reacción se reconoce en que el papel de tornasol azul no se enrojece en contacto del caldo (debe humedecerse el papel con una gota de agua ordinaria para comparar); el papel rojo se volverá azul. Cuando se ha añadido demasiado álcali, se vierte gota a gota ácido fosfórico (o también láctico o clorhídrico). Un pequeño exceso de álcali (CO_3Na , no NaOH) casi no perjudica (véase gelatina, página 16).

Neutralizar empleando como indicador la fenoltaleína (v. pág. 20, núm. 4).

4. Hervir en corriente de vapor $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora.

5. Filtrar. Ensayar nuevamente la reacción del



líquido filtrado, corregirla en caso necesario, nueva ebullición y filtración. En caso de que el líquido filtrado, después de frío, no aparezca transparente, se filtra otra vez o se aclara como la gelatina (véase más abajo, párrafo 2).

6. Esterilizar en matraces o en tubos de ensayo después de llenos, en corrientes de vapor $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora durante dos o tres días consecutivos o en la autoclave según la pág. 10, núm. 3.

Gelatina

1. Al agua de carne, adicionada de las mismas sustancias que para preparar el caldo, se le añade, además un 10 % (en verano 15 %) de gelatina blanca superior.

2.—6. Como en el caldo (véase más arriba). Si después de rectificar la reacción no se obtiene un líquido filtrado transparente del todo, a pesar de emplear un filtro compacto, se añade a la gelatina enfriada a unos 50°, la clara de un huevo de gallina o 10-20 cc. de jugo de carne, obtenido por prensación de carne ordinaria en frío, se agita fuertemente y se filtra otra vez después de una ebullición conveniente.

La gelatina permanece sólida hasta 20-27° (véase más abajo), funde lentamente a temperatura algo superior, a 35° rápidamente y se solidifica pronto otra vez a temperaturas inferiores a 20°. La gelatina no debe hervirse muchas veces ni durante largo rato, especialmente en el autoclave, a más de 100° (tolera la calefacción a 110° durante 15 minutos una sola vez) porque sufre cambios en su punto de solidificación. El punto de fusión es tanto más elevado cuanto menos tiempo se hierve y más bajo cuanto más frecuen-



temente o durante más tiempo. En la gelatina preparada recientemente como antes se ha dicho, es algo más bajo que en la que se guarda solidificada 24 horas o más.

Gelatina especial con punto de fusión elevado

Preparada según Forster

Se disuelven 100-150 gr. de gelatina (en el comercio se encuentra gelatina «dura» especial) en 1 litro de caldo estéril y calentado a 60° (en una pequeña caldera). Se añade KOH hasta que quede reacción débilmente ácida y luego se alcaliniza débilmente con CO_2Na_2 . Luego se añade una clara de huevo. Se coloca la caldera dentro de una marmita grande con agua hirviendo, y se revuelve bien la gelatina; ésta se calienta a 98-99° en unos tres minutos. Luego se hace hervir la marmita junto con la gelatina, convenientemente tapada, durante unos 15 minutos. Se filtra en caliente, por un embudo calentado con agua a 60°, el cual se ha esterilizado previamente junto con el filtro, el matraz o colector y el aparato para la distribución. Se recoge toda la gelatina en un matraz, se distribuye, después de esterilizada, en tubos estériles que se calientan durante 20 minutos en corriente de vapor y se enfría rápidamente sumergiéndolos en agua fría. La gelatina queda así estéril y dispuesta para el uso; su punto de fusión oscila, después de conservarla varios días, entre 29-30°; antes es algo más bajo. (La parte esencial de la preparación es el tiempo que se hace hervir; véase más arriba).

La *gelatina ligeramente alcalina* se emplea para muchas bacterias. Una adición de 10-15 cc. de solu-



ción normal de CO_3Na_2 por litro de gelatina, después de neutralizada ésta, no es casi nunca perjudicial. Ciertas bacterias exigen una alcalinidad mayor (véase más adelante). 10 cc. de solución normal de CO_3Na_2 equivalen a 5,3 cc. de solución al 10 % de CO_3Na_2 anhidro, o a 14,3 cc. de solución al 10 % de CO_3Na_2 cristalizado. Una solución al 10 % de CO_3Na_2 cristalizado, contiene 3,7 % CO_3Na_2 , la solución normal 5,3 %.

Agar

1. Al agua de carne, adicionada de las mismas sustancias que para preparar el caldo, se le añade además 1 $\frac{1}{8}$ —2 % de agar—agar cortado en pequeños pedazos o pulverizado. Es conveniente dejar en maceración el agar difícilmente soluble, durante un par de horas, antes de añadir las demás sustancias, facilitándose así su disolución.

2. 3. 4. Como el en caldo (véase pág. 14).

Se ensaya la reacción, corrigiéndola si es necesario.

5. El medio de cultivo turbio y con grumos debe filtrarse. La filtración no es fácil por el papel de filtro, aun operando en embudo caliente o en corriente de vapor. Se filtra mucho mejor por algodón en rama. Se coloca el algodón, doblado en cuatro capas en el interior del embudo, debiendo sobresalir un poco del borde, se calienta el embudo así dispuesto en corriente de vapor, durante una hora y se vierte en él en seguida el agar aun caliente. O bien, se renuncia a la filtración total y se deja en reposo durante algún tiempo el agar líquido, en el esterilizador, después de apagar la llama, con lo cual se deposita la mayor parte del enturbiamiento, separando luego por decanta-



ción la parte superior bastante transparente y si hace falta se deja sedimentar otra vez (da buenos resultados el empleo de campanas de pie, altas y estrechas o de copas; se puede dejar solidificar el agar en ellas, extraerlo luego dando golpes y separar la parte turbia, cortándola).

6. Como en el caldo (pág. 14).

Las calefacciones repetidas no alteran el punto de solidificación del agar. Este funde a 90-100° y permanece líquido hasta los 40°; a temperaturas inferiores, se solidifica con rapidez, casi instantáneamente. El agar sólido cede algo de líquido (la llamada *agua de condensación*).

Modificaciones en la preparación del caldo, de la gelatina y del agar

1. El *agua de carne* puede emplearse para preparar medios de cultivo, *diluída unas cuatro veces*, sin que su poder nutritivo se altere.—El agua puede prepararse con otras carnes, además de la vaca y caballo, también se prepara con placentas, con genitales de toro (muy apropiado) y análogos. Puede prepararse también con sangre coagulada cortada en pedazos (se extrae durante 24 horas 1 kilo de sangre con litro y medio de agua, agitando frecuentemente; se decanta, se hierve hasta coagulación, se filtra, etc. La reacción es alcalina, neutralizando *cuidadosamente* con ácidos fosfórico o clorhídrico). Puede emplearse también el agua condensada en las esterilizadoras a vapor de los mataderos. (V. también Hottinger, C. B. I. Or. 67 p. 178).

2. En lugar del agua de carne, puede emplearse.



también, una solución al 1-2 % de *extracto de carne* Liebig. (Es necesaria la adición de sal común). Los medios de cultivo preparados con esta solución, no tienen el mismo valor que los preparados con agua de carne. PARA ANÁLISIS DE AGUAS, se empleará oficialmente la gelatina siguiente: Se disuelven 2 partes de extracto de carne Liebig, 2 de peptona Witte y 1 de ClNa en 200 de agua. Se calienta el conjunto durante $\frac{1}{2}$ hora en la autoclave y se filtra después de frío. A 900 partes de esta solución, se les añade 100 partes de gelatina, se hierve el conjunto durante $\frac{1}{2}$ hora después que la gelatina se haya hinchado y macerado. A la solución caliente se le añaden 30 partes de NaOH al 4 % y luego se le añade gota a gota la misma NaOH, hasta que el papel azul de tornasol no se enrojezca ya. Se calienta 15 minutos en corriente de vapor; se ensaya la reacción y se corrige en caso necesario. Se le añade 1 $\frac{1}{2}$ partes de carbonato sódico cristalizado, no eflorescido, se hierve 30-45 minutos y se filtra. Se distribuye en tubos de ensayo estériles, unos 10 cc. en cada uno (véase pág. 21) y se esteriliza en autoclave durante 15-20 minutos.

Pueden emplearse de modo análogo soluciones al 1 % de extracto de levadura (Kressler, C. B. I. Or 80, p. 380); los cocimientos de levadura son menos convenientes.

3. La casa E. Merck de Darmstadt prepara a partir de los *cubos de caldo Maggi* y siguiendo las prescripciones de Marx (M. m. w. 1910, p. 861) dos productos llamados *caldo-Ragit* y *agar-Ragit* con los cuales se obtienen medios de cultivo hirviéndolos con agua alcalinizada con carbonato sódico y que sirven también para preparar medios de cultivo especiales (p. ej. para el vibrión del cólera y el bacilo tífico). La fábrica Bram de Leipzig prepara medios sólidos análogos, según Dörr. La Ungemach, A.-G. Estras-



burgo-Schiltigheim, prepara diferentes medios de cultivo que vende en latas, aunque su precio es elevado.

4. La *neutralización* es difícil cuando se emplea como indicador el tornasol (pág. 14) porque no se distingue bien el momento en que el papel azul deja de enrojecerse. Más exacta, aunque de uso más limitado, es la NEUTRALIZACIÓN, empleando FENOLTALEÍNA COMO INDICADOR. Se diluyen 5 cc. del medio de cultivo en 45 cc. de agua destilada reciente, en un matraz, y se hierve directamente sobre la llama, unos tres minutos, se le añade luego 1 cc. de fenoltaleína (sol. 0,5 gr. en 100 cc. de alcohol de 50 %) y se valora con solución $\frac{N}{10}$ de NaOH o de ClH, hasta obtener un líquido de color rosado característico. Luego se añade a todo el medio de cultivo NaOH o ClH normales, en proporción a los resultados de la valoración y hasta obtener una reacción neutra. Se ensaya de nuevo una porción del medio de cultivo, (5 cc.) como antes y se corrige, en caso necesario, la reacción del conjunto. Se hierve éste y se ensaya de nuevo. Cuando el medio de cultivo da reacción neutra o ligeramente alcalina con la fenoltaleína, resulta fuertemente alcalina para el tornasol, puesto que las peptonas y difosfatos existentes en la solución nutritiva, reaccionan neutro o alcalino con el tornasol y son ácidos o neutros con relación a la fenoltaleína. Así a los medios de cultivo de reacción neutra o ligeramente alcalina con el tornasol, que son las más convenientes para el desarrollo de las bacterias, debe añadirseles ácido todavía para que queden neutros a la fenoltaleína. Añádase 1, 5 % (hasta 2, 5 % y anotando cuanto) de ClH normal se hierve, filtra, esteriliza, etc.

5. La *adición de 2-8 % de glicerina puris.*, a los medios de cultivo, antes de la esterilización (especial-



mente al agar, el llamado *agar glicerinado*) aumenta su utilidad para muchos fines (véase bacilo de la tuberculosis).

Distribución y esterilización de los medios de cultivo

Los tubos de ensayo nuevos (generalmente de 160 mm. de longitud y 16 mm. de diámetro) deben hervirse antes de usarlos, en agua acidulada (conteniendo 1-2 % de ClH) puesto que por la ebullición, ceden álcali, que enturbiaría e inutilizaría los medios de cultivo en ellos contenidos. Lo mejor es adquirir las tubos de vidrio de Jena (firma Schott-Jena) que contienen poco álcali. Los tubos usados se hierven en agua o en corriente de vapor. Los tubos de ensayo se limpian frotándolos con cuidado, se dejan secar, se cierran mediante un tapón de algodón en rama de unos 3 cc. de largo, que se introduce de modo que quede apretado y rebase algo la boca del tubo, se esterilizan en la estufa al calor seco según se dijo en la pág. 10 apart. 2 (la esterilización puede suprimirse en aquellos tubos, que deben llenarse de medio de cultivo y esterilizarse de nuevo).

Para la distribución, se dispone un embudo enlazado con un tubo de goma, provisto en su extremo opuesto de un tubo de vidrio, se tapa el embudo con una cápsula de cristal y se esteriliza todo junto al calor húmedo. Por medio de este aparato, cuyo tubo de goma se cierra con una pinza de Mohr, se vierten 5 cc. de *substancia* en cada tubo y se consigue que al llenar no se manchen las paredes ni el borde superior de los mismos, no pegándose por tanto el tapón de algodón.

Para distribuir cantidades conocidas en los tubos



de ensayo, se emplean embudos especiales (de Treskow) o bien se dispone una bureta graduada, unida por medio de un tubo de goma con un tubo de vidrio adicional, en forma de Y o de T, una de cuyas ramas unidas por un tubo de goma a un matraz colocado en alto, da paso al medio de cultivo, hasta que llegue al o de la bureta, cerrando entonces el paso con una pinza y verificando la distribución por la otra rama provista de tubo de goma, tubo de vidrio y pinza de Mohr, en cantidades conocidas. (Antes de esterilizar los tubos, se hace en algunos de ellos una señal con lápiz graso, en el punto donde alcanzó el contenido, para observar si cambia de volumen por la esterilización.)

Los tubos llenos se esterilizan al calor húmedo (basta $\frac{1}{4}$ de hora, tres días consecutivos por regla general, y si los tubos y el embudo de distribución estaban ya estériles, una sola vez durante $\frac{1}{4}$ de hora) y se deja solidificar el agar o la gelatina manteniendo los tubos verticales o inclinados, con el extremo cerrado por algodón, apoyado en un lápiz o tubo de cristal, etc.; el contenido no debe mojar el algodón, porque éste quedaría pegado luego.

Agua de peptona

En lugar del caldo, puede emplearse muchas veces una solución de 1-2 % de peptona (Witte-Rostock) y 0,5-1 % de ClNa en agua destilada (o común). Para ciertos fines (reacción del indol pág. 49) añádasele además 0,01 % de NO_3K y 0,02 % de CO_3Na , cristalizado. Esterilización como en el agua de carne. Para investigar el Bact. coli en las aguas (v. cap. IX) es preferible conservar esterilizada en matraces la solu-



ción siguiente: peptona 10, cloruro sódico 5, glucosa 10, agua 100. Para *investigaciones de cólera* se prescribe oficialmente la siguiente solución: peptona seca Witte y ClNa $\overline{\text{m}}$ 100, NO_3K 1, CO_3Na crist. 20, agua dest. 1000; hiérvase, fíltrese y esterilícese. Para los cultivos se diluye al 1 : 9.

Medios a base de suero sanguíneo

Se recoge la sangre que fluye por el cuello del animal (buey, carnero, caballo), al degollarlo para matarlo, en vasijas cilíndricas previamente limpiadas con sublimado, alcohol y éter, una después de otra y se guardan estas vasijas durante 24 horas en un sitio fresco. Por medio de una pipeta o de un sifón, estériles, se absorbe el suero transparente o ligeramente coloreado que se separa y se reparte en tubos de ensayo estériles. (La separación del suero se acelera agitando el coágulo sanguíneo, por medio de una varilla de vidrio estéril, algunas horas después de recogida la sangre.)

Por una calefacción prolongada a 70° , se transforma el suero en una masa sólida y bastante transparente, en la cual se separa algo de «agua de condensación»; es preferible mantener los tubos en posición inclinada, en aparatos especiales para coagular suero (v. pág. 22, párrafo 2.º).

El suero así obtenido, contiene casi siempre gérmenes muy resistentes. Para obtener tubos de suero libres de gérmenes, se puede emplear la esterilización fraccionada (v. pág. 11, apart. 4 b) aunque este procedimiento no es completamente seguro. O bien, se dejan en una estufa 24 horas y se separan aquellos en que hay germinación (enturbamiento del «agua



de condensación», frecuentemente en el 50% y más). O se distribuye el suero en frascos de medicamentos, se le añade de 1-2 % de cloroformo y se cierra con tapón de goma; después de conservarlos algunos meses de este modo (conviene tener provisión de ellos) quedan la mayor parte exentos de gérmenes (el cloroformo se expulsa por el calor). La filtración para separar los gérmenes es muy lenta y circunstancial en el suero (v. pág. 11, núm. 4 c). Lo más seguro es recoger la sangre estéril, sangrando asépticamente en el mismo laboratorio un carnero o becerro, colocando en la carótida una cánula estéril y conduciendo la sangre a un matraz estéril, por medio de un tubo de goma también estéril, unido a la cánula, operando luego como antes se ha dicho. Cuando el suero se utiliza líquido como medio de cultivo, el procedimiento mejor de obtenerlo es el descrito. Pueden obtenerse pequeñas cantidades de sangre de animales grandes introduciéndoles una cánula esterilizada por la yugular, después de afeitar y limpiar la piel.

En la mayor parte de los casos, la pequeña opalinidad del suero no resulta inconveniente esterilizándolo después de coagulado en posición inclinada, a 95-98° durante tres días, $\frac{1}{2}$ hora cada día, en un aparato de coagular suero (o también al calor húmedo a 100°, aunque en este caso la superficie del medio se hace desigual por la formación de burbujas). Como precaución, pueden tenerse los tubos durante 24 horas a 37° y separar los germinados (enturbiamiento del agua de condensación) antes de usarlos.

En lugar de los tubos de ensayo, se puede coagular el suero en cápsulas de vidrio dobles (las llamadas de Petri, v. pág. 33) y esterilizar como antes. En las cápsulas preparadas recientemente puede estorbar el agua de condensación, por lo que conviene colocarlas con la tapa hacia abajo; las antiguas se secan mucho



por la superficie y a menudo se encuentran en ellas gérmenes extraños.

Pueden emplearse, como medio de cultivo del mismo modo que el suero, los líquidos: *ascítico*, de *quistes ováricos* y el de *hidrocele*, coagulado o líquido (la reacción es con frecuencia muy alcalina; conviene ensayarla siempre y corregirla si es necesario).

(Modo de obtener suero sanguíneo para la suero-reacción, v. caps. VII y VIII).

Suero sanguíneo adicionado con caldo

(*Suero de Löffler*)

El poder nutritivo del suero puede aumentarse añadiendo (antes de llenar los tubos) por cada 3 ó 4 partes del mismo, una parte de caldo ligeramente alcalino (preparado con 1 % de peptona, $\frac{1}{2}$ % de CINa y 1 % de glucosa). La facultad de coagularse no se perjudica por esta adición; no obstante, deben aplicarse temperaturas más elevadas (90-95°) para producir una buena coagulación.

Suero humano

Véase al tratar de los gonococos, número 1, y además cap. VII.

Agar-suero

El suero sanguíneo, líquido y estéril, calentado a 40-50°, se mezcla en partes iguales o al 1 : 2 con agar (al 2 ó 3 %) líquido y enfriado a 40-50°. La mezcla se coagula por enfriamiento. Antes de la coagulación,



se siembra y luego se extiende en placas (págs. 31 y 34) o se coloca en tubos inclinados o en capsulitas, y luego se siembra en la superficie (pág. 37); del mismo modo se prepara el *Ascites-Agar* y el *Hidrocele-Agar* (véase gonococos, núm. 1).

Huevos

La cáscara del huevo se limpia cuidadosamente con jabón y con sublimado al 5 % en caliente, se lava con agua estéril y se seca con algodón estéril. Para sembrarlo, se practica una pequeña abertura en uno de los extremos, se siembra y se cierra la abertura con lacre o con papel estéril y colodión. Es un mal medio de cultivo, porque a menudo no está estéril.

La clara de huevo coagulada (con o sin yema) en cápsula o en tubos, se prepara perforando el huevo por los dos extremos, después de esterilizado exteriormente y vertiendo su contenido en cápsulas o tubos estériles, coagulando en el aparato del suero, del mismo modo que éste y esterilizando luego. Si se quieren separar la clara y la yema se rompen los huevos del modo usual.

Patatas

1. *Patatas en discos, con piel* (Koch).

Se toman patatas de buena calidad, se lavan con una escobilla, en el chorro de la fuente. Luego se separa con un cuchillo los llamados ojos y las manchas podridas y se ponen las patatas en solución de sublimado al 1 % durante $\frac{1}{2}$ hora. Se lavan con agua, se cuecen $\frac{3}{4}$ de hora en autoclave abierta, se cogen con las ma-



nos limpias, y mediante un euchillo estéril, se cortan en dirección al diámetro mayor, se separan las porciones resultantes y se colocan en la cámara húmeda (grandes cápsulas dobles, en cuyo fondo se ponen papel de filtro humedecido con agua) guardándolas de modo que no estén en contacto unas con otras. Se sembrarán en el centro de la superficie.

En la piel de la patata, quedan muchas esporas que resisten la cocción, las cuales germinan pronto en toda la patata, por lo cual, se prefieren los dos siguientes procedimientos en los que se separa la piel.

2. *Patatas mondadas y en discos o rodajas.*

Las patatas limpias como en el núm. 1. se mondan y cortan en discos de 1-2 cm. de altura. Los discos se colocan en cápsulas dobles, estériles y se esterilizan al calor húmedo (lo más seguro es tenerlas a 110-120° durante 1 hora, con lo cual las patatas se arrugan y vuelven de color pardo, o repetirla a 100°, $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora)

3. *Patatas mondadas, en cuña.*

Se perforan las patatas limpias, con un taladro que se introduce en la dirección del eje mayor, quedando después de separada la porción externa, un cilindro, que se secciona longitudinalmente con un euchillo estéril, en dos cuñas. Cada cuña se coloca con la base hacia arriba, en un tubo de ensayo estéril, en cuyo fondo hay un poco de algodón o un pedazo de tubo de vidrio, que evita que el fragmento de patata, esté en contacto con el agua que se separa de la misma por la cocción. Esterilización como en el núm. 2.

4. *Pulpa de patata.*

Las patatas cocidas, se machacan con agua o leche hasta obtener pulpa, que se distribuye en capas de 1 cm. de altura, en matraces Erlenmeyer y se esterilizan al calor húmedo.

Las patatas tienen reacción ácida. Para muchas



bacterias que son sensibles a los medios de cultivo ácidos, se aumentará el poder nutritivo de aquéllas, hirviéndolas con solución de ClNa al 3 % o de CO_3Na , al 1 % y separándolas luego cuidadosamente. Patatas glicerizadas (véase cap. VI).

Pan

Se pulveriza pan moreno seco; se echa en un matraz Erlenmeyer, hasta cubrir el fondo de éste, y se le añade agua hasta formar una papilla consistente. Se esteriliza en corriente de vapor o mejor en el autoclave. De reacción ácida, excelente medio de cultivo para los mucoráceos.

Leche

Se coloca leche fresca, de reacción anfótera al tornasol, y aun mejor descremada por centrifugación, en tubos de ensayo y se hierve en corriente de vapor, tres días consecutivos, durante $\frac{1}{2}$ -1 hora. (Temperaturas de 110° o superiores, hacen pardear el medio). Antes de sembrar se ensaya la esterilidad, teniéndolos por lo menos tres días a 37° .

Soluciones nutritivas sin albúmina

Según Uschinsky C. Fränkel.

Se disuelven 5,0 de ClNa , 9,0 de fosfato sódico o potásico, asparragina o asparraginato sódico 4,0 y



lactato amónico 6,0 en 1000 de agua común, se alcaliniza ligeramente con NaOH y se esteriliza como el caldo.

(V. en la pág. 50, una solución análoga).

Otros medios de cultivo

Veáse capítulo VI y el índice.

Conservación de los medios de cultivo

REGLA GENERAL: *En todos los medios de cultivo que se quieran conservar, debe anotarse en la vasija, el día en que se acabaron de preparar, la composición y la reacción.*

Los medios de cultivo se echan a perder muchas veces al guardarlos, particularmente por desecación y porque a pesar de cerrar bien el tapón de guata, entran mucedíneas. Pueden evitarse ambas cosas bien quemando el extremo abierto del tubo o matraz y la parte externa del tapón de guata, y colocando encima un dedal de goma que ajuste perfectamente y que se calienta en corriente de vapor (también con papel de estaño esterilizado o con una capa de metal fusible, v. cap. X, B núm. 4); o bien, se guardan las vasijas que contienen los medios de cultivo, dentro de cajas de hojalata (botes de galletas), con tapa que ajuste perfectamente y en los que se coloca además un pedazo grande de papel de filtro o de guata, humedecido en esencia de clavo.

A los medios de cultivo que se han secado, se les



añade el agua que se ha evaporado y se esterilizan de nuevo (debe mezclarse bien. No puede aplicarse al suero coagulado ni a las patatas en fragmentos). Los medios que empiezan a enmohecerse, pueden aprovecharse repitiendo las esterilizaciones.



IV

Métodos de cultivo.—Generalidades

Procedimiento de las placas

El procedimiento de las placas sirve para la separación de *diferentes especies de bacterias*, en una mezcla de éstas. Los gérmenes se distribuyen en un medio sólido fundido, en el cual ocuparán diferentes sitios al solidificarse. De este modo se desarrollan las bacterias, cuando el medio es apropiado, en colonias aisladas y distantes unas de otras.

1. *Placas de gelatina*: Se funden tres tubos de gelatina en baño de agua a 30°-35°. Uno de ellos (núm. 1) se coge con la mano izquierda, de modo que quede sujeto entre el pulgar y el hueco de la mano, en *posición inclinada* y con la boca hacia la derecha, sepárase el tapón de guata, sosteniéndolo entre *dos dedos de la mano izquierda*, de modo que la porción que debía introducirse en la boca del tubo, quede en la parte inferior y fuera del contacto de los dedos. (La misma disposición debe observarse en todas las siembras hechas con cultivos puros, etc.) Con una òse de platino enrojecida y enfriada de nuevo, se toma un indicio de la materia bacteriana y se desmenuza sobre la pared del tubo con la parte superior de la



gelatina. La öse de platino, se calienta de nuevo al rojo y se guarda. Se cierra el tubo con el tapón de algodón; se reparte la siembra de bacterias en la gelatina, haciendo girar el tubo, inclinándolo y poniéndolo de nuevo vertical (no debe agitarse nunca, pues las burbujas que se formarían, constituyen luego colonias aparentes. La gelatina no debe tocar el tapón de guata!).

Luego se coge de nuevo el tubo como se ha dicho antes, se abre y se coge el segundo tubo de idéntico modo, abriéndole también. Con la öse de platino esterilizada, se pasa tres veces contenido del tubo 1, al tubo 2, se pone al rojo la öse y se cierran ambos tubos. El núm. 1 se vuelve al baño de agua. El tubo núm. 2 se mezcla como antes el núm. 1 y luego se toman del mismo 3 öse y se siembran en el tubo 3, mezclando el contenido como ya se dijo.

(Cuando se opera con materiales muy ricos en bacterias, se siembra menos, pasando de un tubo a otro sólo 1-2 öse o se siembra un cuarto o quinto tubo; puede suprimirse el tubo núm. 1 y emplear en su lugar, para la primera dilución, un tubo con agua estéril).

Después de quemar de nuevo el borde del tubo y de dejarlo enfriar, se vierte la gelatina en el aparato de verter, puesto horizontal, en el cual se colocan previamente placas de vidrio secas (esterilizadas dentro de cajitas de lata) y se reparte aquélla con el borde del tubo, de modo que queda un anillo de 1 cm. alrededor de la placa. Después de solidificada la gelatina, se colocan las placas numeradas (1, 2, 3) sobre caballetes de vidrio, dentro de una campana grande, en cuyo fondo se coloca un pedazo de papel de filtro humedecido. Las placas deben ser de un tamaño que permita observar cualquier punto de las mismas en el microscopio.



Mejor que las placas de vidrio, son las llamadas cápsulas de Petri (dobles de 9-10 cm. de diámetro en la cara plana) que pueden llenarse sin aparato repartidor (levantando un poco uno de los bordes de la cubierta, para verter el medio de cultivo), no se contaminan tan fácilmente por los gérmenes del aire y no dejan escurrir la parte del medio licuado por el crecimiento de bacterias, como sucede en las placas sencillas. En lugar de la tapadera de vidrio pueden utilizarse en las placas dobles tapaderas de porcelana sin vidriar, que absorbe el agua desprendida de los medios de cultivo vertidos en caliente y evitan que al condensarse aquélla caiga sobre la superficie sembrada. (Las tapas de porcelana las proporciona la fábrica de porcelana de Bürgel, en Turingia). Mejores aún resultan las tapas de hoja de lata barnizada, recubiertas interiormente con una capa de yeso (se hace una papilla con 400 gr. de yeso tamizado y 330 de agua, vertiéndola inmediatamente). Las fabrica la casa Hackel y Picht de Berlín, Landbergerstr. 109, a 55 marcos el millar, de 102 mm. de diámetro.

Si no se dispone de placas, ni de cápsulas de Petri, se preparan *tubos rodados*. Se coloca un dedal de goma sobre el tapón de guata y se pone el tubo casi horizontal bajo el chorro de agua fría, dándole un rápido movimiento de rotación, obteniendo así la gelatina solidificada en capa uniforme alrededor de las paredes. Conviene tomar tubos con poca gelatina (a lo más 5 cc.) y dejar enfriar ésta, hasta casi solidificarse, antes de extenderla. En verano, se extiende sumergiéndola en una cápsula con agua helada. No deben tocarse con la mano caliente al guardarlos! Poco apropiados en presencia de bacterias que licuan mucho la gelatina.

Deben rotularse en seguida todos los cultivos, con lápiz graso o con etiquetas, consignando clara y

B.—TÉC. BACTER.



exactamente la fecha de la siembra y la procedencia.

2. **PLACAS DE AGAR:** Se preparan igual que las de gelatina, con tubos de agar fundido y enfriado a 40° próximamente (sólo pueden emplearse cápsulas de Petri, porque el agar no quedaría compactamente pegado en las placas de vidrio, por la pérdida de agua de condensación). Debe operarse rápidamente, porque el agar se solidifica con facilidad (v. pág. 18). Las placas deben calentarse ligeramente antes de verter en ellas el agar. Los tubos extendidos salen mal. Las placas de agar se guardan con la tapa hacia abajo, porque de otro modo el agua de condensación que se separa, va a parar de nuevo con facilidad toda ella a la superficie del medio de cultivo donde se desarrollan las colonias arrastrándolas; para absorber el agua condensada conviene introducir en la tapa un disco de papel de filtro esterilizado y seco, o mejor aun, se utilizan las tapas de porcelana sin vidriar o las de vidrio recubiertas de yeso (v. pág. 33). Para la preparación de placas de AGAR-SUERO, véase página .

VENTAJAS DE LA GELATINA: que la mayor parte de las colonias se desarrollan en ella con formas características.

INCONVENIENTES DE LA GELATINA: que permanece sólida, a lo más, hasta los 30° (la preparada del modo usual sólo hasta 22°-24°, particularmente en placas) y no a la temperatura del cuerpo humano. Se licua fácilmente (peptonización) por muchas bacterias, dificultando su aislamiento en las placas.

VENTAJAS DEL AGAR: que permanece sólido a la temperatura del cuerpo humano, empleada en los cultivos. No se licua por el desarrollo de las bacterias, pudiendo ser conservadas las placas mucho más tiempo que las de gelatina.

INCONVENIENTES DEL AGAR: que las colonias se



desarrollan, frecuentemente, en formas muy poco características.

DILUCIONES CON EMPLEO DE POCA GELATINA O AGAR: Se pone un cierto número de gotas de caldo o de gelatina, sobre una placa estéril o sobre la tapa de una cápsula Petri, se siembra la primera con el material analizado, de ésta la segunda, de ésta la tercera, etc., y de las gotas así preparadas uno o varios tubos de gelatina o de agar que se vierten luego en placas.

Observación de las placas

Las colonias que se desarrollan sobre las placas, se observan con objetivos de poco aumento, diafragma estrecho y espejo cóncavo. Para observar cápsulas de Petri, se les quita la tapa o, si no se quiere hacer esto, se colocan en el microscopio con el fondo donde esté el cultivo, vuelto hacia arriba y en contacto con el objetivo.

Si las colonias no están muy juntas, se hace la siembra a simple vista tocando con la aguja de platino en la colonia escogida. Por el contrario, si están aquéllas muy juntas se sigue la técnica siguiente: se enfoca con poco aumento la colonia que se va a estudiar, y con la punta de una aguja de platino fina y corta (es preferible doblarla un poco) se pica en la colonia observando al mismo tiempo por el microscopio (evitando siempre el tropezar el objetivo) la placa o el medio de cultivo; para lograrlo conviene apoyar sobre la platina el dedo meñique de la mano que sostiene la aguja. Después de picar, se separa la aguja con idénticas precauciones. El material tomado se utiliza para obtener preparaciones o cultivos puros.

Como análisis de orientación se hacen las *prepa-*



raciones por compresión: se coloca, sobre el sitio de la placa que se estudia, un cubreobjetos esterilizado a la llama y frío, se comprime fuertemente y se levanta cogiéndolo por los bordes con una pinza anatómica; la fijación y coloración se hacen según se indica en la pág. 54. Este método es muy conveniente para orientarse acerca de las clases de colonias que existen y para el estudio de colonias superficiales muy pequeñas y que no pueden picarse. Del sitio de la placa donde se hace una preparación *por compresión*, no debe tomarse ya material para obtener cultivos, porque al aplastar las colonias sencillas pueden haberse mezclado unas con otras.

Modo de contar los gérmenes (v. cap. VIII).

Dosaje del material de siembra (v. cap. IX).

Preparación y resiembra de los cultivos puros

Preparación de los cultivos en placas: Se toma por picadura, con la aguja de platino (v. pág. 35) un poco de materia de una colonia aislada, y con ella se siembra el medio nutritivo, contenido en tubos de ensayo. En los medios líquidos, se introduce la aguja varias veces. En los sólidos, no transparentes, se hace en la superficie una estría longitudinal o una serie de estrías en varios sentidos; en los tubos que contienen el medio de cultivo transparente, solidificado en posición inclinada, se procede lo mismo (*siembra en estría*). Conviene no romper la superficie. Si se introduce la aguja en el medio de cultivo solidificado, estando el tubo en posición vertical, obtendremos una *siembra por picadura*. Si se quiere observar al microscopio el desarrollo del cultivo por picadura (con pequeño aumento), se hace la picadura junto a la pared del tubo, en lugar de hacerlo en el centro.



Resiembra de cultivos: Se efectúa, pasando una pequeña cantidad de materia, en la òse o con la aguja de platino enrojecida y dejada enfriar, a un nuevo tubo con medio nutritivo. La posición de los tubos, ha de ser la misma que se adopta en las diluciones (v. pág. 32) o bien (sólo en los tubos de gelatina), con la boca hacia abajo.

Para conservar los cultivos bacterianos basta por regla general pasarlos cada 4-6 semanas a nuevos medios de cultivo, aunque muchas especies, particularmente las patógenas, necesitan pasos más frecuentes (p. ej. b. influenza, gonococos, pneumococos).

Para evitar que los cultivos se sequen, aun conservándolos en la estufa, se cierra la boca del tubo con un dedal de goma o bien se impregna el tapón de guata con parafina fundida de modo análogo al descrito en el cap. X, B. A los cultivos viejos secos, se les añade caldo estéril, se dejan 24 horas en la estufa y se siembran luego. Las bacterias conservan su vitalidad durante muchos meses si se empapan cortas hebras de seda (seda Turner 4) en cultivos de aquéllas, o (mejor aún) en sangre u otros líquidos albuminosos, en los que estén contenidas, se desecan dichas hebras en capsulitas estériles, en un desecador sobre Cl_2Ca y luego se guardan en tubos de ensayo pequeños, colocados en el interior de otros mayores en cuyo fondo hay Cl_2Ca , cerrados por algodón y un dedal de goma.

Substitución del procedimiento en placas por siembras fraccionadas

En lugar de repartir la materia que contiene bacterias, en el medio de cultivo y verter éste luego en



placas, fijando los gérmenes al solidificarse, se puede proceder al aislamiento de los mismos, haciendo estrías con el material bacteriano en la superficie del medio de cultivo, solidificado en placas o en tubos inclinados. Se procede tomando con una öse, un pincelito de platino (éste araña fácilmente la superficie al sembrar) o con un poco de algodón estéril, la materia que se quiere sembrar y se pasa por toda la superficie del medio. En la mayor parte de los casos, debido a la gran superficie que presentan las placas, basta sembrar una sola para obtener colonias aisladas, a no ser que se haya tomado mucha materia o que ésta sea muy rica en bacterias. Cuando se siembra con la öse, se pica con la materia que la misma contiene, un punto de la superficie del medio de cultivo y se extiende con la anilla por toda la cara superficial; también puede utilizarse, para la repartición en las placas, una varilla de vidrio doblada en ángulo recto. En las placas de agar o de suero sanguíneo se vierte previamente el agua de condensación, o se deja evaporar en la estufa. Los tubos solidificados en posición inclinada, se deben sembrar generalmente, uno después de otro. Si se ha separado del medio de cultivo agua de condensación, esta misma puede servir para hacer las diluciones. Para ello se moja la anilla de platino en el agua cargada de gérmenes y luego se pasa por toda la superficie del suero, repitiendo la operación con un segundo y un tercer tubo, sin cargarla de nuevo. En la mayor parte de los casos, en el segundo y tercer tubo se desarrollan muchas colonias aisladas. En los medios de cultivo que se funden y solidifican con dificultad (p. ej. suero sanguíneo coagulado, patatas), éste es el único método que puede emplearse para el aislamiento de los gérmenes. Para la gelatina no es conveniente.



Cultivos procedentes de un solo germen

En el método de las placas y en las siembras fraccionadas nunca se tiene la seguridad de si cada colonia procede de una sola bacteria o de varias de la misma clase. El método de la *tinta china* de Burri («Das Tuscheverfahren», Jena, G. Fischer 1909) permite en cambio efectuar con seguridad siembras de un solo germen. Para ello se toma tinta china *Pelikan 541* (de Grübler, Leipzig) diluída al 1 : 9, se ponen 10 cm. cúbicos en cada tubo de ensayo, se esterilizan en la autoclave y se dejan en reposo dos semanas, utilizando luego el líquido superficial. Con una anilla grande de platino, enrojecida y lavada con agua estéril, se toman 4 gotas de la suspensión de tinta china y se colocan sobre un portaobjetos desengrasado y esterilizado. Luego se pasa con rapidez un poco de material bacteriano a la gota núm. 1, y con una anilla pequeña de platino se lleva un poco de líquido de la gota 1 a la gota 2, de ésta a la 3, etc. Con una pluma caligráfica esterilizada a la llama y fría, se hacen con la gota 4, varias series de puntos sobre una placa de gelatina bien solidificada, tapándolas al cabo de medio minuto con cubreobjetos esterilizados y observándolas con objetivo seco de mucho aumento. De este modo aparecen las bacterias brillantes sobre el fondo de partículas negras de tinta. Se marcan por la parte inferior de la placa, los puntos en los que se ha visto una sola bacteria. Se levanta con cuidado el cubreobjetos y se siembra con la colonia procedente de un solo germen.—Si la siembra debe hacerse en un medio distinto de la gelatina, se procede en un principio como antes y luego se siembra de los puntos



señalados sobre la gelatina, al medio que se desea. Al separar el cubreobjetos de la gelatina las bacterias y la gota de tinta quedan adheridas a él. Las gotas de tinta cargadas de gérmenes resultan muy a propósito para el examen de las bacterias muy finas, etc., que aparecen brillantes sobre el fondo negro de la tinta.

Para cultivos monocelulares de levaduras v. también el párrafo correspondiente.

El cuerpo animal como medio para obtener cultivos puros

Muchos organismos patógenos, pueden aislarse en una mezcla de bacterias, por intermedio del cuerpo animal. Para ello es necesario, que con el microorganismo inoculado en los órganos internos del animal, no vayan mezclados otros gérmenes patógenos para aquél. Por medio de la inoculación (técnica, cap. VIII) se difunde una sola especie de microorganismos patógenos, la cual puede ser recogida completamente pura en los órganos internos del animal, después de muerto éste. (Se emplea p. ej. para aislar el b. anthracis, b. de la septicemia de las ratas, b. tuberculoso, b. del muermo, los pneumococos). Para hacer siembras de los cadáveres, es preferible preparar primero cultivos en placas, y luego, a partir de éstas, los cultivos puros. Si se quieren obtener en seguida cultivos puros, se hacen las siembras no por picadura, sino por estría, para que se puedan observar más fácilmente las colonias extrañas que puede haber. No conviene sembrar en medios líquidos, porque en ellos es difícil reconocer las contaminaciones.



Cultivos en gota suspendida de caldo, gelatina, etc.

Se hacen para observar directamente el desarrollo de las bacterias. Modo de operar, v. págs. 2 y 3.

Cultivo de los anareobios

A los medios de cultivo, destinados a los anareobios, conviene añadirles 1-2 % de glucosa o también 0,3-0,5 % de formiato sódico ó 0,1 % de sulfoindigotato sódico (de color azul, se decolora por el desarrollo de bacterias, generalmente por reducción—v. pág. 49 Nr. 4).

Muchos anareobios son esporígenos. Examínese al microscopio la materia en la que deben aislarse; si se encuentran en ella anareobios con esporas (que se reconocen por su forma generalmente; abultamiento central o terminal producido por las esporas) pueden destruirse numerosas formas parásitas de anareobios facultativos, que no quieran reproducirse, calentando el material que ha de sembrarse, durante media hora, a 55-70°, con lo cual no se perjudica a los anareobios obligados y así pueden obtenerse en seguida cultivos puros de éstos. Sin embargo, deben hacerse siempre siembras con materia sin calentar.

Como métodos de cultivo se recomiendan los siguientes:

1. Siembras sin aislar del aire

Se consigue hacer germinar muchas clases de anareobios en tubos de caldo muy llenos y sin aislar



del aire, sembrando en las capas profundas del caldo recientemente hervido y añadiendo a éste sustancias reductoras, tales como pedazos de hígado, bazo, riñones, seso de animales (crudo o hervido) huevo duro, patatas en puré y también esponja de platino (Tarozzi). Las adiciones no deben hacerse en cantidad pequeña (se pone, por lo menos, 1 cc. por cada 10 cc. de caldo) y se esterilizan junto con el caldo. La siembra debe hacerse inmediatamente después de frío. Deben conservarse sin agitarlos o recubrirlos con una capa de 2 cm. de parafina.

2. Métodos por separación mecánica de oxígeno

a) *Cultivos en capas profundas.* Se llenan tubos de ensayo hasta $\frac{1}{4}$, con gelatina o agar, se hierven convenientemente, se enfrían rápidamente con agua fría, sin agitar y se siembran. Dan buenos resultados en el aislamiento de bacterias, si se introduce el material de siembra en el medio todavía líquido, sin introducir aire por agitación, se reparte bien y se hacen diluciones como en el procedimiento de las placas, sembrando en otros 2-3 tubos más. Después de solidificados aquéllos, viértese cuidadosamente encima (después de quemar la boca de los tubos) el contenido de otros dos tubos, fundido y caliente a lo más a 40°. Para la observación y aislamiento de las colonias desarrolladas, se rompen los tubos y se corta el medio en el sitio deseado, por medio de un cuchillo esterilizado o bien se siembra de una colonia aislada sin romper el tubo, tomando materia con una aguja larga o con un capilar fino, obtenido con tubo de cristal estirado a la lámpara.

Para la resiembra de cultivos puros, se disponen cultivos por picadura (que alcance hasta las capas



más profundas) en tubos llenos hasta $\frac{1}{4}$ de medio de cultivo, hervidos recientemente y rápidamente solidificados.

También, puede ponerse sobre la superficie una capa de 2 cm. de aceite o de parafina líquida esterilizados, que impide la llegada de aire hasta el medio de cultivo después de expulsarlo por ebullición (resulta un método poco limpio, porque al resembrar, la grasa estorba). Modificaciones ulteriores (v. Ghon y Sachs, *Ctrlbl. f. Bakt. Abt. I. Or.* 32, pág. 403).

Los anareobios pueden desarrollarse bien asimismo, en la rama cerrada de un tubo de fermentación (v. pág. 47).

b) *Absorción del aire por medio de una bomba aspirante* (Gruber). Los tubos sembrados se colocan en baño de agua a 30-35° (los de agar a 42°). El tapón de goma parafinado que cierra los tubos, está provisto de un tubo de vidrio que ajuste bien y que termina en la superficie inferior del tapón; este tubo está enlazado con una bomba aspirante. El medio de cultivo se lleva a la ebullición a presión reducida; al cabo de $\frac{1}{4}$ de hora, ha sido arrastrado todo el aire, cerrando entonces el tubo de enlace a la lámpara por un estrangulamiento de que está provisto. La gelatina puede repartirse finalmente como en los tubos rodados (v. pág. 33).—Para el método combinado con 3, véase además, Emmerling. *Hyg. Rdsch.* 1904, página 452.

3. Métodos con absorción del oxígeno (Buchner)

Se colocan los tubos o cápsulas sembrados (estas últimas abiertas y colocadas unas sobre otras, sostenidas por varillas de vidrio) en una vasija de vidrio que cierre herméticamente (p. ej. en un frasco ancho,



cerrado con tapón de goma parafinado, o en un desecador). En el fondo de éste o en una capsulita, se coloca solución de ácido pirogálico y en el último instante, antes de cerrar la vasija, se le añade con una pipeta lejía de potasa. La solución alcalina de ácido pirogálico absorbe el oxígeno. Se calcula, según *Buchner*, como necesario para 100 cc. de aire, 1 gr. de ácido pirogálico (disuelto en 2-3 cc. de agua) y 10 cc. de solución potásica formada por 1 de KOH al 15 % y 10 de agua. La absorción completa del oxígeno a la temperatura de la estufa, exige unas 24 horas; si la lejía se añade caliente, la absorción es más rápida.—Para cápsulas aisladas es preferible el método de Lentz (C. B. I. Or. 53, pág. 358): sobre una placa de vidrio se coloca un aro grueso de papel de filtro impregnado con solución de pirogalol y desecado luego, protegiéndolo exteriormente con una capa de 3-4 mm. de plastilina. Se humedece el aro de papel con potasa al 1 % (sin que llegue a escurrir) y en seguida se coloca encima la placa de cultivo sembrada que se adhiere por compresión a la plastilina. El examen microscópico puede hacerse sin necesidad de levantar el cierre. De modo análogo se disponen cultivos en tubos, mediante los llamados lápices de pirogalol.

4. Métodos de desalojamiento del oxígeno por el hidrógeno

Se cierra el matraz o tubo que contiene el medio de cultivo sembrado, mediante un tapón de goma biperforado y provisto, en uno de los orificios, de un tubo de vidrio doblado en ángulo recto, que penetre profundamente en el líquido nutritivo y en el otro orificio, de un tubo también doblado y que no sobresalga de la cara inferior del tapón (disposición igual



a la del frasco lavador !). Por el primer tubo se conduce una corriente de H_2 , producido en un aparato de Kipp, y lavado en solución de IK y en solución de ácido pirogálico + KOH , hasta que encendiendo el gas que sale por el extremo del otro tubo, estirado en punto capilar, arde con pequeña llama tranquila. Luego se cerrará por fusión el extremo afilado del tubo, mientras pasa la corriente. El tapón de goma puede recubrirse con parafina fundida para cerrarlo herméticamente al aire. Si la vasija de cultivo contiene gelatina, ésta puede repartirse después de pasar la corriente de H_2 , como en los tubos rodados (véase página 33).

Conviene precaverse del peligro de explosión que resulta de encender demasiado pronto el gas que sale. (La mezcla de aire e hidrógeno resulta detonante.). Lo mejor es recoger este último en un tubo de ensayo invertido, que se coloca en el tubo de desprendimiento y encender su contenido, cuando se considera que todo el aire que se hallaba en el interior de la vasija ha sido expulsado. Si el gas arde con llama tranquila y con un ligero chasquido, se trata de H_2 puro, puede encenderse entonces el gas que sale sin peligro. O bien se hace pasar el tubo de desprendimiento, por agua de jabón, hasta que las burbujas se enciendan sin detonar.

Modificación del método para cultivos en cápsulas (Blücher). En una cápsula de vidrio bastante grande, que contiene una capa de solución de a. pirogálico de 1 cm. de altura, se coloca en el centro, abierta y sostenida por un soporte de alambre, la cápsula conteniendo el agar o gelatina sembrados. Se coloca encima de un embudo invertido, de modo que su borde quede sumergido en la sol. de a. pirogálico y se le mantiene fijo mediante un aro de plomo. Por el tubo del embudo se introduce H_2 , que expulsará el aire.



por debajo el borde de aquél. Después de pasar algún tiempo la corriente, se cierra mediante una pinza el tubo de goma que da paso al gas, por encima del embudo; se corta la goma junto a la pinza y se llena la porción de tubo que sobresale con parafina líquida. Finalmente, se añade más KOH y solución de ácido pirogálico por medio de una pipeta y se vierte parafina líquida entre la cápsula grande y el borde del embudo.—Grandes aparatos parecidos, para muchos cultivos, de Botkin (Zschr. f. Hyg. Tom. 9) y Novy (Ctrbl. f. Bakt 16).

Procedimientos para el estudio de las condiciones especiales de vida de las bacterias

1. *Ensayos sobre la necesidad de oxígeno.* Se preparan cultivos, según uno de los métodos descritos para sembrar anaerobios, núms. 2 a 4. (pág. 41 y sigs.). Las bacterias aerobias obligadas no germinan (al mismo tiempo, debe sembrarse el mismo medio de cultivo en contacto del aire). Ensayos más sencillos: Ver si hay fermentación en la rama cerrada, de un tubo para germinaciones (v. núm. 2) o en cultivo (v. pág. 42 apart. 2 a) en la parte más profunda del medio.

2. *Ensayo sobre el poder de fermentación.* Pueden utilizarse como sustrato, medios nutritivos que contengan 0,25-0,5 % de glucosa (u otro azúcar) (v. pág. 14 caldo, n.º 1). Los medios de cultivo deben estar exentos de otras clases de azúcar, diferentes del que se añade de propósito. Por esto, en caso de que se trate de caldo de cultivo, se prepara éste con carne vieja y algo descompuesta. Luego se ensaya el con-



tenido en azúcar, de una muestra del caldo, con *Bact. coli*, sembrada en tubos de fermentación (v. más abajo); si existe azúcar fermentable, se siembra el caldo con *Bact. coli*, se tiene en la estufa a 37° durante 6-12 horas, se hierve luego, se filtra (en caso necesario según pág. 11 nr. 4 c), se ensaya de nuevo en el tubo de fermentación con el *Bact. coli*, y se repite el tratamiento en caso de que haya todavía desprendimiento de gas. Finalmente, se neutraliza y añade la clase de azúcar que se quiere ensayar. Se neutraliza con sosa o fosfato sódico ácido, nunca con carbonato sódico, porque los ácidos fuertes producidos en la germinación, darían lugar a un desprendimiento de CO_2 en burbujas, que constituirían una aparente fermentación del azúcar.

En los medios de cultivo sólidos, el desarrollo de organismos con poder de fermentación (siembra por picadura o por distribución en el medio fundido) da lugar a la formación de burbujas que desgarran el medio.

Como aparatos especiales de cultivo, se emplean tubos de vidrio doblados en forma de U (o los llamados matraces de fermentación) una de cuyas ramas, larga y cerrada, se llena completamente con el medio de cultivo líquido, escogido para fermentar; en el extremo de esta rama se recogen los gases desprendidos en la fermentación. La otra rama abierta, provista de un tapón de guata, debe contener pequeña cantidad de líquido o estar provista de un ensanchamiento, destinado a contener el líquido desalojado de la otra rama por los gases desprendidos en la fermentación.—También puede introducirse en un tubo de caldo un tubito de ensayo de 2-3 cm. de largo y hacer que se llene de líquido, teniéndolo boca abajo. Si las bacterias sembradas producen gases, éstos irán a reunirse en el extremo cerrado del tubito.



3. *Ensayo sobre la formación de ácidos y álcalis.* Cualitativo: El ensayo más sencillo consiste en humedecer una tira de papel tornasol para ver la reacción y comprobarla con una muestra del mismo medio de cultivo sin sembrar. Cuantitativo: Valorar una cantidad conocida del mismo, con soluciones $\frac{1}{10}$ o $\frac{1}{100}$ normales de un ácido o álcali y emplear como indicador el tornasol o la fenolftaleína.

Para hacer patentes los cambios de reacción sufridos por el medio a consecuencia del desarrollo de las bacterias, puede añadirse al mismo una pequeña cantidad de tintura de tornasol o solución acuosa de azolitmina al 1 : 100 y dejar la reacción de modo que la adición de una gota de ácido o álcali, en solución $\frac{1}{100}$ normal, dé coloración roja o azul sensible; luego se esteriliza (si con esto cambia la reacción, se corrige ésta y se esteriliza otra vez) y se siembra. A menudo, los medios con tornasol se decoloran por reducciones debidas al desarrollo de las bacterias, particularmente en las capas profundas (v. además pág. 49 núm. 4). Luego se ensaya si el medio se colorea de nuevo por agitación (absorción de oxígeno).

Los cambios de reacción son más visibles en el *suero tornasol de Petruschky*: Se calienta leche a unos 40-50°, se le añade un volumen igual de agua y el ácido clorhídrico necesario (no demasiado) para precipitar toda la caseína. Se filtra para separar el precipitado. Se neutraliza el líquido filtrado con sol. de CO_2Na , (exactamente), se hierve 1-2 horas en corriente de vapor, se filtra hasta que pase claro (corregir la reacción si es necesario).—Debe quedar incoloro o amarillo verdoso—se le añade tintura de tornasol hasta que quede de color violeta, se distribuye y se esteriliza.

Otros medios de cultivo coloreados, para reconocer los cambios de reacción. Se describen al tratar de b.



del tifus y el de la disentería y meningococos.

Al agar y gelatina se recomienda también añadirles creta finalmente pulverizada y esterilizada antes de sembrar. El aclaramiento o transparencia del medio de cultivo, alrededor de una colonia naciente o de un cultivo, prueba la formación de ácidos.

4. *Ensayo sobre el poder reductor.* Se siembra en medios de cultivo a los que se añade materias fácilmente decolorables por reducción, como sulfo-indigotato sódico (indigotina, pág. 41, párraf. 2). Tornasol (pág. 48, nr. 3) azul de metileno (de éste, debe añadirse solamente 1-2 gotas de solución al 1 %, por cada 100 partes de medio de cultivo, puesto que en mayor cantidad produce retraso en la germinación). La decoloración se produce solamente en la parte del medio de cultivo no accesible al aire; por esto resulta más apropiada la observación en los cultivos de anaerobios o en los medios de cultivo sólidos. Los medios líquidos decolorados por reducción, se colorean de nuevo agitándolos en contacto del aire.

5. *Ensayo acerca la formación de gas sulfhídrico.* Se añade al medio de cultivo un 3 % de tartrato de hierro (preparado disolviendo en ácido tartárico, $\text{Fe}_2(\text{OH})_6$, obtenido por precipitación de Cl_2Fe , por la potasa, lavado y escurrido en un paño; la sol. se añade a la gelatina y se esteriliza al calor húmedo); o bien se suspende debajo del tapón de guata, una tira de papel de filtro humedecido en acetato de plomo; o bien se humedece el extremo del tapón de algodón, introducido en la boca del tubo, en solución hervida de acetato de plomo. Un ennegrecimiento del medio de cultivo, del papel o del algodón, denota formación de SH_2 .

6. *Ensayo acerca de la formación de indol.*

1. Según *Kitasato Salkowski*.—Se añade a un cultivo puro, en caldo peptonado o en agua



de peptona, 1 cc. de solución al 0,01 % de nitrato sódico y 1 cc. de ácido sulfúrico puro (1 + 3 de agua destilada). Al cabo de 5 minutos aparece un color rojo en presencia de indol. —Muchas bacterias, además del indol, producen nitritos por reducción de nitratos existentes (o adicionados) en la peptona (vibrios del cólera u otros parecidos). —Sus cultivos dan por esta causa, la coloración roja con sólo añadir ácido sulfúrico o clorhídrico (sin añadir NO_3Na) — es la llamada *reacción del nitrosoindol*.

2. Según *Ehrlich* (Böhme, C. B. I. T. 40, pág. 129). Se añaden a 10 cc. del cultivo líquido, 5 cc. de sol. a) y luego, 5 cc. de sol. b) y se agita. Si hay indol se produce coloración roja a los 5 minutos. Más sensible que el anterior. La solución a) consta de: 4 de paradimetilamidobenzaldehído + 380 de alcohol de 96 % + 80 de ClH concentrado. La sol. b): solución acuosa saturada de persulfato potásico ($\text{S}_2\text{O}_8\text{K}_2$).

3. Según Morelli (C. B. I. Or. 50, pág. 413). Se humedecen tiras de papel de filtro en una solución de ácido oxálico saturada en caliente y después de frías se suspenden mediante un tapón de guata en la boca de tubos de cultivo recién sembrados, de modo que quede la tira libre en el centro. Al producirse indol en el cultivo la tira de papel toma color rojo. Puede utilizarse con todos los medios de cultivo, aunque en la gelatina la producción del indol es escasa y muy lenta.

Zipfel (C. B. I. Or. 64 pág. 65) recomienda como medio de cultivo para la reacción del indol: asparagina + lactato amónico 5,0, difosfato potásico 2,0, sulfato magnésico 0,2, triptofano 0,3, agua destilada



1000. Los ensayos se hacen según uno de los métodos 1-3, siendo preferible recubrirlo con 1 cc. de la solución 2 a); la reacción es ya visible al cabo de 24 horas, incluso en las bacterias que producen lentamente el indol.

7. *Ensayo acerca de la producción de luz. (Fosforescencia)*: Resulta ventajoso hacer la siembra en gelatina o agar preparados con caldo diluído de pescado marino o también caldo de carne con 1 % de peptona, 0,5 % de glicerina y 3 % de ClNa o ClK o NO_3K y neutralizado; siémbrese en la capa superficial (resulta necesario el acceso del aire). Obsérvense los cultivos en la cámara oscura, durante algunos minutos por lo menos, porque la luminescencia se percibe con cierta lentitud. En muchas especies se manifiesta la fosforescencia en los cultivos muy jóvenes solamente y durante corto tiempo.

8. *Ensayo de la resistencia al calor y a la desecación. Resistencia para el calor en atmósfera húmeda*: Se introduce en tubos capilares estériles cultivo puro líquido bien germinado, se funden ambos extremos de aquéllos y se colocan en un baño de agua o en autoclave abierta, a la temperatura que se ensaya y durante un tiempo determinado. Se lavan luego los capilares (por fuera) con sublimado, alcohol y con éter, se cogen con unas pinzas estériles, y se introducen en tubos con medio de cultivo apropiado y se rompen en el interior de éstos, mediante una varilla de vidrio esterilizada. Se observa siempre durante varios días si hay germinación. Las esporas resisten siempre la temperatura de 60° , durante media hora, en muchos casos 80° durante 10 minutos.—Todos los cultivos en caldo pueden calentarse del modo descrito; deben sumergirse en el baño de agua, un poco más que el nivel del líquido interior; es preciso colocar un termómetro en uno de los tubos, para com-



probar la marcha de la temperatura. Enfríese rápidamente después de calentar. Antes de sembrar el contenido de éstos, en otros tubos, es conveniente tenerlos en la estufa durante algunos días a una temperatura apropiada; con esto tienen ocasión de desarrollarse los gérmenes que quedaron con vida y pueden reconocerse fácilmente sembrando (abundante cantidad) en caldo reciente.

Resistencia para la desecación: El material de cultivo (caldo de cultivo o bien el medio sólido finamente desmenuzado y empapado del cultivo) se deja secar sobre pedazos de cubreobjetos o varillas de cuerno, esterilizados, colocados en cápsulas tapadas, también estériles; de cuando en cuando se siembra la solución nutritiva y se observa si hay germinación. También puede ensayarse de este modo la acción del calor seco. Del mismo modo, pueden humedecerse en el material de cultivo pequeñas hebras de seda que se desecan y se utilizan para ensayar la resistencia a la desecación, al calor seco y al vapor (suspendiéndolas durante un tiempo determinado, envueltas en papel de filtro, dentro del aparato productor de vapor, o en el de Ohlmüller, calentando a 100°) (hilos de esporas del *b. anthracis*; v. cap. correspondiente).

9. *Ensayos de la resistencia a los desinfectantes químicos.* El poder germicida de los desinfectantes se comprueba haciendo siembras en medios de cultivo que contiene cantidades determinadas de aquéllos.

Un modo muy sencillo de ensayar la *acción bactericida* consiste en colocar en las soluciones desinfectantes de poder diferente, las bacterias desecadas sobre objetos apropiados (v. más arriba, 2.º párrafo) dejándolos en ellas durante tiempos distintos. Antes de hacer la siembra, debe lavarse con agua estéril o con una solución que neutralice el efecto del desinfectan-



te, o bien se siembra abundantemente agitando con energía, y renovando a ser posible el medio de cultivo al cabo de algunas horas.

10. *Ensayo de la acción patógena*, v. cap. VIII.

11. *Ensayo de la formación de toxinas*. Las toxinas pueden estar contenidas en el protoplasma bacteriano o disueltas en el medio de cultivo. *Toxinas disueltas*. Se filtran los cultivos (según pág. 11, 4 c.) o se centrifugan las bacterias, el líquido filtrado se agita con tolueno o se le añade 0,5 de fenol y después de varias horas de reposo se inyecta en animales (v. cap. VIII). Toxinas del protoplasma bacteriano (*endotoxinas*): se hacen las siembras sobre medios sólidos. Para matar los cultivos se humedece el tapón de guata con algunas gotas de tolueno o de cloroformo, se cierran los tubos con la guata y un doble dedal de goma dejándolos luego varias horas en la estufa a 37°, procurando no perjudicar a los demás cultivos; luego se inyectan las bacterias muertas en animales, comprobando al mismo tiempo por siembras si todas ellas habían muerto (para el dosaje del material inyectable, v. cap. VIII).



Métodos de coloración.—Generalidades

Modo de obtener las preparaciones

1. Preparaciones ordinarias

Se limpia cuidadosamente un cubreobjetos. (Preparaciones sobre portaobjetos, v. pág. 58). Se le coloca encima una gota de agua con la òse de platino, y luego (mediante una aguja o òse de platino) una pequeña cantidad de la materia que se analiza. Se extiende la gota de agua en capa uniforme y delgada sobre el cubreobjetos (que debe estar exento por completo de grasa para lograrlo.—Modo de limpiar, v. pág. 8), se deja secar al aire la preparación, pudiendo acelerar la desecación calentando ligeramente el cubreobjetos, por la cara no preparada.

Los líquidos que contienen pocas bacterias, como sangre, pus, se colocan directamente sobre el cubreobjetos, sin añadirle gota de agua (para la sangre v. además cap. VII, 1); si se trata de órganos animales, se arranca un pequeño fragmento de los mismos mediante una pinza estéril y con él se frota la superficie de un cubre; las sustancias con las que difícilmente se puede frotar, como p. ej., esputos viscosos,



tumores nudosos, muchos cultivos bacterianos, se pueden aplastar entre dos cubreobjetos estériles, sostenidos mediante 2 pinzas de Cornet, para extenderlos. Debe cuidarse de que los dedos no se contaminen. (Preparaciones por compresión, v. pág. 36).

MODO DE FIJAR: Los cubreobjetos desecados al aire, se cogen con dos dedos (si no tiene los bordes infectados o manchados, de lo contrario con una pinza de Cornet) junto al borde y se pasan tres veces por la llama de gas o de una lámpara de alcohol, con la cara preparada vuelta hacia arriba, hasta una temperatura que casi no se puede resistir en los dedos. La preparación fijada de este modo se puede colorear cuando se quiera.

La *fijación con alcohol absoluto* y también con alcohol éter $\overline{aa}$, da resultados excelentes y es la preferente cuando se trata de preparaciones de sangre, no alterándolas. Para obtener imágenes delicadas, se recomienda la fijación con ácido ósmico: Se colocan pequeñas cápsulas tapadas con tela metálica, en el interior de grandes frascos de boca ancha cuyo tapón ajuste bien, y en cada una de aquéllas se ponen 5 cc. de solución de ácido ósmico al 1 % (se añaden 10 gotas de ácido acético en las preparaciones de sangre). Sobre la tela metálica se colocan las laminillas, con la cara preparada vuelta hacia abajo y se dejan $\frac{1}{2}$ -2 minutos, luego se lavan si es necesario, con solución muy débil de MnO_4K . Se dejan secar al aire y se colorean. Conviene poner al rojo cada vez la tela metálica, antes de usarla. La solución de ácido ósmico puede actuar durante varias semanas.

Cuando se está en duda sobre qué cara del cubreobjetos es la preparada, se sopla sobre el vidrio—la cara no preparada aparece mate *uniformemente*, mientras que la preparada, no; o bien, se mira si



puede separarse algún fragmento con una aguja fina.

COLORACIÓN: Para teñir, se coge la preparación con una pinza de Cornet (abierta por presión entre los dedos), se echa solución colorante con una pipeta (que no debe tocar la preparación) hasta que quede cubierto uniformemente el cubreobjetos; los colorantes sencillos, se hacen actuar durante 5 minutos en frío, o 10-60 segundos calentando sobre la llama. Puede teñirse también, colocando el cubreobjetos con la cara preparada vuelta hacia abajo, en un vidrio de reloj con solución colorante, de modo que flote sobre ésta (muy cómodo cuando se trata de coloraciones largas); en caso necesario se calienta el vidrio de reloj colocándolo en un sostén sobre una tela metálica.

LAVADO: En coloraciones sencillas, se lavan las preparaciones con agua corriente (no es necesario que sea destilada). Se coloca el cubre con la cara preparada vuelta hacia abajo, sobre un portaobjetos y se limpia su superficie cuidadosamente con papel de filtro, sosteniéndolo fijamente sobre el porta por un ángulo con la punta de un dedo. Después de esto se observa al microscopio (v. pág. 1 y siguientes.)

Si se ven en la preparación *partículas móviles* y que den continuas vueltas, es señal de que se ha fijado poco sobre la llama o que se ha lavado con un chorro de agua demasiado fuerte.

Si se *evapora el agua de la preparación mientras se observa* ésta, se pone una gota junto al borde del cubreobjetos, que se corre rápidamente entre este último y el porta.

En caso de que después de teñida la preparación deba tratarse por otros líquidos, se echan éstos directamente sobre el cubreobjetos, o bien en copas pequeñas (de las de licor, de fondo plano) o en vasijas parecidas, en las que se sumergen los cubreobjetos.



INCLUSIÓN EN BÁLSAMO: Para observar las preparaciones, puede emplearse también el bálsamo del Canadá o el aceite de cedro (del usado en inmersiones), en lugar del agua. Se coloca el cubreobjetos en posición vertical sobre papel de filtro apoyado en algún objeto y se aguarda hasta que se haya secado o bien se seca cuidadosamente después de teñido y lavado, entre papel de filtro ordinario (comprimiéndolo únicamente, sin frotar, porque si no podrían perderse partículas de la preparación; luego con un pincel fino se separan los hilos del papel que hayan quedado). Luego se pone en la cara teñida del cubreobjetos una gota de aceite de cedro del de inmersión o de bálsamo del Canadá, espeso, disuelto en xilol y se coloca comprimiéndolo, sobre la superficie limpia y seca de un portaobjetos. El bálsamo o el aceite, no deben rebasar el borde del cubreobjetos; en caso de que esto suceda, se separa el exceso con papel de filtro mojado en xilol al cabo de algunos días, si se ha solidificado ya y el cubre está sólidamente unido al portaobjetos; del mismo modo se separa el aceite que haya quedado sobre el cubre. El bálsamo del Canadá aun el que no tiene reacción ácida, decolora a menudo las preparaciones con el tiempo; por esta razón es preferible montar en aceite de cedro las que quieran conservarse. La parafina líquida conserva aun mejor; en este caso deben bordearse los cubre con cera o mástic especial.

Rotúlense en seguida todos los preparados y consérvense en sitio obscuro.

Si se quieren montar las preparaciones en agua para conservarlas, debe quitarse primero con papel de filtro el aceite de inmersión de su superficie y vertiendo abundante agua alrededor del borde se separa del portaobjetos; se deja secar y se monta luego como antes se ha dicho.



PREPARACIONES SOBRE PORTAOBJETOS: Sobre éstos, se pueden obtener preparaciones secas, del mismo modo que sobre los cubreobjetos. Son recomendables para el caso en que quiera teñirse y observarse de una sola vez mucha materia. Fijar y teñir la capa como en los cubreobjetos. Para la observación, se deseca la superficie con papel de filtro o al aire, se pone una gota de aceite de inmersión y se examina sin cubre. En caso de que deseen conservarse, se protegen los puntos más interesantes de la preparación con uno o varios cubreobjetos o bien se quita el aceite de inmersión lavando con éter y se guarda la preparación al abrigo del polvo.

Determinación del tamaño de las bacterias: Puede hacerse de modo aproximado por comparación con los glóbulos rojos (en la sangre humana, tienen éstos un diámetro de 7,7 a 8,7 μ por término medio); si no se dispone de ellos (p. ej. en los cultivos), se mezcla el material bacteriano con una gota de sangre extraída de un dedo. La medida exacta se hace mediante los micrómetros oculares.

2. Preparaciones de cortes

ENDURECIMIENTO DE LOS FRAGMENTOS DE TEJIDOS: Se endurecen pequeños fragmentos de órganos del tamaño de la yema de un dedo a lo más, teniéndolos por lo menos durante tres días, en alcohol absoluto que se renueva muchas veces. (En el fondo de la vasija empleada para indurar, se coloca una hoja de papel de filtro. Sobre ésta se colocan los fragmentos orgánicos que han de endurecerse; con esto se consigue tenerlos siempre en las capas superiores de alcohol menos acuosas. De este modo pueden conservarse durante años; no obstante muchas bacterias pierden



poco a poco la propiedad de teñirse). Antes de endurecer por el alcohol, se pueden tener los pedazos 12-24 horas en formalina, para tener una buena fijación —Método rápido (véase pág 61).

Para obtener cortes se emplean los microtomos y se procura obtener cortes muy delgados (finos). Para este objeto se preparan antes los tejidos endurecidos, por *inclusión* o *encolado*, para lo cual se emplean los siguientes métodos (1 y 2 se emplean sólo para tejidos compactos y parenquimatosos, el 3 y 4 especialmente para tejidos flojos y para pequeños pedazos).

1. ENCOLADO CON GELATINA GLICERINADA: Se disuelven en caliente 10 partes de gelatina en 40 de glicerina + 20 de agua. Una gota de la solución, se coloca sobre un pedazo de corcho y encima, apretándolo, se pone el pedazo que se destina a cortes y el conjunto se echa en alcohol absoluto durante un par de minutos. La glicerina se coagula al cabo de pocos segundos, y el pedazo queda dispuesto para los cortes. Estos se colocan en una cápsula con alcohol de 50 %; la cuchilla del microtomo se humedece con este alcohol para efectuar los cortes.

2. INCLUSIÓN EN CELOIDINA: Los fragmentos indurados en alcohol, se ponen 1-8 días en celoidina flúida disuelta en alcohol + éter aa, luego, durante el mismo tiempo, en celoidina espesa, separándolos de ésta junto con la celoidina que llevan adherida, mediante una espátula y colocándolos sobre cubos de corcho o de madera sin apretarlos mucho. Si la celoidina se ha secado fácilmente al aire, después de algún tiempo, se colocan los fragmentos en alcohol de 50 a 60 % (nunca absoluto!) para dejar endurecer aquélla, y al cabo de 24 horas están en disposición de hacer los cortes. Estos se colocan en una capsulita con alcohol de 50 %; la cuchilla se humedece en el mismo alcohol.

3. INCLUSIÓN EN PARAFINA: Los fragmentos en-



·durecidos, se ponen en xilol durante algunas horas, (hasta que estén transparentes), luego durante un tiempo igual, en una solución de parafina en xilol, después en parafina fundida y caliente a 50° (mezclando diversas clases de parafina, se puede obtener una de este punto de fusión) teniéndolos en ésta (en baño de parafina caliente a 50°, que se regula de igual modo que las estufas) durante 1-2 horas. Los fragmentos de órganos completamente empapados en parafina, se cogen con una espátula, se colocan sobre una lámina de vidrio limpio, se les coloca encima moldes de cristal, metal o de cartón cuadrangulares y de unos 2 cm. de altura, de modo que el fragmento quede en medio, y se vierte en su interior parafina caliente hasta llenarlo; la parafina puede solidificarse rápidamente sumergiendo la placa de vidrio en agua fría. Los bloques de parafina se proveen de etiquetas (sujetándolas con alfileres), en caso de que no se destinen inmediatamente a obtener cortes. Antes de efectuarse esto, debe separarse con un cuchillo la parafina, hasta que aparezca en la superficie el objeto incluido. Se corta con la cuchilla del microtomo en seco. Los cortes se colocan en una cápsula con agua caliente a 40-45°. En esta se extienden rápidamente los cortes, quedando lisos en la superficie. Se separan del agua con un cubreobjetos limpio, de modo que queden extendidos sobre éste, se coloca el porta en posición inclinada, se lava con agua, se deseca completamente en la estufa a 37° y luego en estufa de parafina, hasta que ésta se funda y empieza a escurrirse. Se separa entonces la parafina enjuagando con xilol y éste se separa con alcohol absol. El corte queda sólidamente adherido al portaobjetos. Para teñirlo, lo mejor es colocarlo verticalmente dentro de una de las cubetas especiales.

CONGELACIÓN EN ESENCIA DE ANÍS: Se separa



cuanto sea posible el alcohol de los fragmentos de tejidos, absorbiéndolo con papel de filtro, y luego se pone por lo menos 24 horas en esencia de anís (licuada en la estufa a 37°, y colocada luego, junto con los fragmentos orgánicos, en frascos de vidrio que cierren perfectamente y puesto todo en la estufa a 37°). Luego se coloca el objeto, junto con algunas gotas de esencia, en un microtomo especial, se congela la esencia mediante vapor de éter y se efectúan los cortes. Se colocan éstos en esencia de anís caliente a 37° y se les separa la esencia después de fundida, absorbiéndola y sumergiendo los cortes en alcohol absoluto, que se renueva varias veces antes de teñir. Se puede emplear la manteca de cacao de un modo parecido.

ENDURECIMIENTO E INCLUSIÓN RÁPIDOS:

- a) Según Lubarsch (D. m. W. 03. nr. 48.) Los fragmentos de tejidos (lo más recientes posible) de 1-5 mm. de grueso, se tratan en caliente (en estufa de parafina a 50-60°):—1. 10-15 minutos en solución de formalina al 10 %.—2. En alcohol de 90-95 %, 5 o 10 minutos, renovando el alcohol una vez.—3. 10 minutos en alcohol absoluto; (renovar éste una vez).—4. Sumergirlo en aceite de anilina claro, hasta que el fragmento esté del todo transparente (10 a 30 minutos).—5. Separar el aceite de anilina con xilol, cambiar dos o tres veces el xilol hasta que no se coloree en amarillo (10 a 20 minutos).—6. Incluir en parafina 10-60 minutos—Duración del procedimiento de 1 1/2-3 horas.
- b) Según Henke-Zeller (Ctrbl. f. path. Anat. 05. Nr. 1). Los fragmentos de tejidos de 1-3 mm. de grosor se dejan durante 30-40 minutos en acetona anhidra a 37°, y luego durante el mismo tiempo, en parafina. Duración del método de 1-1 y 1/2 hora.
- c) Según Scholz (D. m. W. 05. nr. 11). Los fragmentos de tejidos de un grueso de 3-5 mm. se po-



nen en la estufa a 37°, durante 30-50 minutos en acetona pura. Luego se agitan con éter + alcohol absol. $\overline{a}$, se incluyen en celoidina flúida (siempre en la estufa). A las 4-5 horas, en celoidina espesa durante 2-3 horas. Pasarlos a capsulitas planas. Desecar rápidamente, debajo de una campana, por el vapor de cloroformo; y hacer los cortes a las 12-14 horas.

Para teñir los cortes, se separan del alcohol y se les somete primero a la coloración simple (1-3 cortes cada vez) en capsulitas (son preferibles los pocillos de cristal cuadrangulares a los vidrios de reloj, que pueden volcarse fácilmente) empleando siempre soluciones filtradas recientemente. (Colocándolos en la estufa a 37°, se acelera por regla general la coloración.) Luego se hace la «diferenciación» de los elementos de los tejidos, coloreados difusamente al principio, dándoles colores apropiados; para ello se emplean ácidos diluídos, alcohol diluido o ácido (v. indicaciones especiales, en métodos de coloración simple). Los cortes teñidos intensamente al principio, se aclaran. Luego se deshidrata con alcohol absoluto (para preparar el ulterior aclaramiento de los cortes). Los cortes quedan en seguida duros y rígidos, por lo cual deben ponerse desde luego bien extendidos; deben mantenerse en las capas superiores del alcohol porque son menos acuosas. Luego para aclararlos se ponen en aceite de cedro (no el de inmersión denso, sino el aceite ordinario) o en esencia de bergamota, de orégano o de clavos (decoloran fuertemente) o en xilol (se enturbia con sólo un indicio de agua). Desde las cápsulas con las esencias, se pasan los cortes a un portaobjetos y pueden observarse en la esencia, cubriéndolos con un cubreobjetos. Si se quieren conservar, se absorbe la esencia, se enjuaga con xilol y se colocan sobre el corte unas gotas de



bálsamo del Canadá disuelto en xilol, poniéndole encima un cubre. Los cortes aclarados con xilol no se deben observar en éste porque se evapora, sino en bálsamo del Canadá. El bálsamo se endurece en pocos días. Para separar el bálsamo excedente, v. pág. 57 Para las inclusiones en parafina líquida, v. pág. 57 Los cortes desecados sobre el portaobjetos (v. pág. 60), se tratan de modo análogo, vertiendo encima los colorantes o bien sumergiendo todo el portaobjetos en la solución. Los no incluidos en parafina, pueden también desecarse sobre los portaobjetos y colorearse. Véanse métodos de coloración simple.

Observar siempre con poco aumento al *principio* para orientarse en la coloración de los cortes y en las alteraciones patológicas groseras de los tejidos.

Para manipular los cortes, se emplean preferentemente agujas de vidrio apropiadas, que se obtienen estirando a la lámpara varillas macizas, y fundiendo el extremo (no se emplean agujas metálicas que son atacadas por muchas de las sustancias empleadas en la coloración). Las espátulas (de platino o de otros metales) se emplean preferentemente para extender los cortes sobre los portaobjetos.

Substancias empleadas en la coloración de las bacterias

Se emplean principalmente los siguientes colores básicos de anilina: Violeta de genciana y violeta metilo, dalia, azul de metileno, fuchina y (los compuestos muy semejantes) rubina, pardo Bismarck (vesubina). Además de las bacterias, se tiñen intensa y permanente los núcleos celulares. Los demás elemen-



tos de los tejidos en grado menor. Las soluciones de azul de metileno no actúan bien en caliente, las demás soluciones sí.

Para teñir los elementos de los tejidos con colores de contraste, se emplean para las bacterias (además de los básicos) colores ácidos de anilina (eosina p. ej.) que no tiñen bien los núcleos, y entre otros colorantes, el carmín (muchos microorganismos se tiñen también con este colorante; tales son, p. ej.: *stafilococcus pyogenes*.) Se emplean sólo colorantes de fábricas acreditadas para evitarse fracasos.

Preparación de soluciones sencillas para la coloración simple

(La fábrica de productos químicos Bram, de Leipzig, prepara colorantes en forma de tabletas según Beintker, que se disuelven en caliente en 10 cc. de agua destilada).

1. *Soluciones en alcohol acuoso:*

Se tienen guardadas las *soluciones madres* de los colorantes, o sean soluciones saturadas en alcohol absoluto, en la estufa (poniendo en un frasco de tapón esmerilado, alcohol absoluto y materia colorante hasta que no se disuelva más.) Las soluciones madres van mal para colorar. Con ellas se preparan las soluciones colorantes, filtrándolas sobre agua destilada, hasta que la solución puesta en un tubo de ensayos, ancho, empiece a hacerse opaca. Es preferible siempre preparar soluciones recientes!

2. *Soluciones acuosas:*

Se pone un exceso de materia colorante en agua destilada, se agita y se filtra al cabo de algunas horas. Lo mejor es prepararlas siempre de nuevo!



En general se observa que resultan mucho mejor las preparaciones, cuando se emplean soluciones diluidas pero que actúan largo tiempo, que cuando se emplean concentradas y por corto tiempo.

Soluciones reforzadas de colores de anilina

Tiñen más intensamente que las soluciones sencillas.

a) *Solución de azul de metileno, según Loeffler.*
30 cc. solución saturada de azul de metileno, en alcohol.

100 cc. de potasa al 0,01 % ($=1$ cc. de potasa al 1 %, en 100 de agua). Inalterable, duradera.

b) *Soluciones colorantes de agua de anilina.* Se echa aceite de anilina (del todo claro) en un tubo de ensayo, hasta llenar el fondo del mismo; llénase luego hasta $\frac{3}{4}$ con agua y se agita fuertemente. Después de la agitación debe quedar aceite de anilina sin disolver. El líquido filtrado por un filtro húmedo, debe ser claro como agua (no verter la anilina en el filtro!) y no ha de contener gotitas de aceite (en caso necesario filtrarlo de nuevo). Se le añade luego solución alcohólica saturada de violeta genciana, violeta metilo o fuchina hasta que el líquido esté casi opaco (puesto en un tubo de ensayo) o hasta que aparezca en la superficie una película nacarada. O bien, se disuelve la materia colorante en agua de anilina, hasta que quede una parte insoluble. El poder colorante de la solución se aumenta añadiendo 1 cc. de solución de KOH al 1 % por cada 100 cc. Estas soluciones son alterables, y el agua de anilina también.

c) *Fuchina fenicada, según Ziehl-Neelsen:*

5.—TÉC. BACTER.



100 cc. de ácido fénico al 5 %.

10 cc. de solución naturada de fuchina en alcohol.

Se emplea diluída al 1 : 3 ó 1 : 4 y durante largo rato y también sin diluir, sin que por esto tiña más fuertemente. Muy estable.

d) *Violeta de metilo o de genciana, fenicada:*

Preparado con 100 cc. de agua fenicada al 2, 5 %

+ 10 cc. de solución alcohólica saturada del colorante. Es muy estable.

e) *Fuchina fenicada, glicerizada, según Czaplewski:*

1 gr. de fuchina se deshace en 5 cc. de ácido fénico líquido. Añadir 50 cc. de glicerina y luego 100 cc. de agua dest. Se emplea diluída hasta 4-10 veces. Inalterable.

f) *Azul metileno fenicado, según Kühne:*

1,5 de azul metileno.

10 cc. de alcohol absol.

100 cc. de ácido fénico al 5 %. Se conserva bien.

g) *Tionina fenicada, según Nicolle:*

Solución saturada de tionina en alcohol de 50 %

10 cc. + agua fenicada al 1 %, 100. Estable.

h) *Azul de metileno boratado, según Manson; v. página 65.*

Coloración simple de los frotos

Se efectúa principalmente con soluciones de azul de metileno, fuchina, violeta de genciana, como se ha dicho en las pags. 54 y 62 .

La elección del colorante, depende de la predilección del observador por uno u otro color. Muchas bacterias, se colorean mejor no obstante, con unos colorantes determinados, que con los demás. (v. g. b. diftérico vibrión colérico). La sangre, el pus, fro-



tes de tejidos, se colorean generalmente de un modo perfecto, con el azul de metileno o con fuchina fenicada, diluída al 1 : 10 (v. más arriba, párrafo c).

Coloración simple de cortes

a) Según *Loeffler*:

1. Teñir con solución alcalina de azul de metileno (agua de anilina o solución de fuchina fenicada) 5-30 minutos.
2. Diferenciar en ácido acético al $\frac{1}{10}$ -1 %, hasta que el tejido quede bien patente (algunos segundos o hasta medio minuto, según el grueso del corte y la intensidad de coloración).
3. Deshidratar en alcohol absoluto (renovándolo, mientras se coloree).
4. Aclarar con aceite de cedro, etc. Los bacilos y tejidos aparecen azules (o rojos):

b) Según *Pfeiffer*:

1. Colorar en fuchina fenicada diluída (sol. Ziehl + aq. al 1 : 3).
2. Pasarlo al alcohol absol. + 1-2 gotas de ácido acético en cada capsulita. Tan pronto los cortes empiecen a aparecer rojoviolados,
3. Pasarlos al aceite de cedro o xilol, etc.

c) Con *violeta de genciana*:

1. Teñir con solución acuosa 15-30 minutos.
2. Lavar primero con alcohol al 50 %, luego con alcohol absol. hasta que los cortes tengan color violeta claro.
3. Aclarar en aceite de cedro, etc.

d) Según *Kühne Pregl*:

1. Colorar en azul de metileno fenicado $\frac{1}{10}$ -1 minuto.



2. Enjuagar con un poco de agua.
 3. Decolorar en alcohol al 50 % hasta tener los cortes de color azul pálido (con un tono verdoso).
 4. Deshidratar en alcohol absol.
 5. Aclarar en aceite de cedro, etc.
- e) Método del azul de metileno-tanino según Nicolle:
1. Teñir con azul de metileno alcalino o con el fenicado como en a y d.
 2. Enjuagar en agua o en ácido acético al $\frac{1}{3}$ -1 % algunos segundos.
 3. Pasarlo a una solución de tanino al 10 % (por lo que el azul de metileno se hace insoluble) durante algunos segundos. (También es suficiente una solución de tanino al 1 %.)
 4. Enjuagar en agua, deshidratar en alcohol absol., aclarar en aceite, etc.
- Se emplea para bacilos que se decoloran fácilmente. (Tifus, muermo, etc.).

f) Método a la thionina, según Nicolle:

1. Teñir en solución de thionina $\frac{1}{3}$ -1 minutos (sol. saturada de thionina en alcohol al 50 % y se ponen 10 en 100 de agua fenicada al 1 %).
 2. Enjuagar en agua.
 3. Deshidratar en alcohol absol., luego aceite, etc.
- El resto como en el método e) para bacilos fácilmente decolorables.

Los métodos a), b) y f), se prefieren por su sencillez y excelentes resultados.

Coloración de bacterias aisladas, coloración por contraste

I. Coloración con azul-fuchina, a) según Pick-Jacobsohn. Para frotis: teñir durante 8-10 segundos a lo



más, por una mezcla de 15 gotas de fuchina fenicada Ziehl (pág 65, c.) 8 gotas de solución alcohólica saturada de azul de metileno, y agua destilada 20,0. Las bacterias aparecen en azul oscuro, los núcleos azul claro, el resto del tejido rojo (la solución colorante envejecida se arregla añadiéndole un poco de fuchina fenicada). b) Según *Frosch* (C. B. I. Or. 64 pág. 118). Para frotos: se tiñe con solución alcohólica de fuchina diluída, y en seguida con azul *patent* de Höchst (2-3 gotas de solución acuosa saturada + 15-20 cc. de agua destilada reciente + 1-2 gotas de ácido acético glacial) hasta que la preparación aparezca azul verdosa. Para cortes, una gota de solución azul en 30 cc. de agua destilada. Las bacterias y núcleos aparecen rojos, los tejidos azules, los eritrocitos verdes.

II. Coloración *con azul de metileno-eosina*. Para frotos, teñir medio minuto con una mezcla reciente de 30 partes de solución de azul de metileno de Loeffler (pág. 65) con 10 de solución alcohólica saturada de eosina. Lavar con agua. Las bacterias y núcleos quedan azules, el protoplasma celular y el resto rojo. Para cortes es recomendable el método de Lentz para los corpúsculos de la rabia.

III. Según *May-Grünwald*. (Zentralbl. f. inn. Med. 1902, núm. 11).

Se mezclan unos 1000 cm. de solución acuosa de eosina al 1‰, con 1000 cm. de azul de metileno medicinal Höchst, también al 1‰ y se filtra al cabo de algunos días. El residuo se lava con agua, hasta que ésta pase limpia. Luego se disuelve el residuo seco en alcohol metílico, hasta obtener solución saturada y se emplea (sin fijar previamente en el cubreobjetos) para teñir en frío (se hace actuar la solución, sin diluir, durante 5 minutos, con objeto de fijar, luego se diluye en un volumen igual de agua). Luego se enjuaga con agua + algunas gotas de solución. Emplear colorantes



del Dr. Schwalm, München-Sonnenstrass. 10. y doctor Grübler, Leipzig. Especial para preparaciones de sangre y pus. *Assmann*, M. M. W. 1906, núm. 28, recubre las preparaciones con 40 gotas de solución durante 3 minutos en cápsulas de Petri, añade luego 20 cm. agua destilada + 5 gotas de CO_2K_2 al 1‰, agita y deja teñir durante 5 minutos. Luego se deseca, sin lavar, etc.

IV. **Coloración de Gram.** (Al mismo tiempo que para teñir las bacterias, se emplea como medio diagnóstico, ya que sólo algunas especies determinadas se tiñen perfectamente; v. pág. 72).

a) *Preparaciones ordinarias (frotos).*

1. Teñir la preparación con solución violeta de genciana-agua de anilina o con violeta metilo-agua de anilina (v. pág. 65) en caliente, por lo menos 2 minutos. Las materias colorantes más apropiadas, son los violetas de metilo Höchst 6 B y B N. Luego, sin lavar,
2. 30 segundos a 2 minutos, en solución iodo-iodurada. (Se disuelven 1 de iodo + 2 IK en 5 de agua destilada y después de disueltos se añaden 295 de agua destilada) de este modo se forma en el cuerpo de ciertas especies bacterianas (véase cuáles, pág. 72) una materia colorante iodada, insoluble en alcohol.
3. Decolorar la preparación en alcohol absoluto, hasta que a la vista aparece incolora. Así las bacterias aisladas que se tiñen por el Gram, quedan de color negro-azulado; todas las demás y los elementos de los tejidos (hasta los núcleos sencillos) incoloros. Se pueden observar los cubreobjetos o bien:
4. Teñir por contraste con soluciones de vesubina, safranina o fuchina en alcohol acuoso o con picrocarmín (v. página 74) durante 2-10 minu-



tos. Esta segunda coloración, hecha con vesubina o fuchina, tiene la ventaja de que las bacterias que no se colorean por el violeta se tiñen mejor que con safranina o carmín.

5. Lavar con agua etc.

Las bacterias que toman el Gram quedan negro-azuladas. Los tejidos rojos.

b) Cortes (aplíquense aquí las observaciones de a).

1. Teñir como en a), durante 5-30 minutos.
2. Pasar la preparación 1-2 minutos a una solución de iodo-iodurada. Los cortes toman color pardo negruzco.
3. Lavar con alcohol absoluto, hasta que el corte aparezca incoloro del todo o casi incoloro. Con ello, quedan teñidas en azul negruzco únicamente las bacterias que toman el Gram. Se puede aclarar en aceite de cedro, o bien teñir por contraste el tejido y las bacterias que no toman el Gram. (4-7).
4. Coloración de contraste con picrocarmín (v. pág. 74), safranina o fuchina diluida 5-10 minutos (después de un lavado con agua o alcohol diluido).
5. Enjuagar en alcohol de 60 %.
6. Deshidratar en alcohol absoluto.
7. Aclarar en aceite de cedro, etc.

Pueden anticiparse los números 4-5 y efectuar luego 1-3 y 7.

Las bacterias que se tiñen según Gram toman color azul-negro, los tejidos, rojo (núcleos celulares, frecuentemente azul-pálido hasta azul-oscuro). En la mayor parte de los casos, las bacterias no se tiñen, con igual perfección en todos los puntos de la preparación.

Para *acelerar la decoloración* pueden emplearse en lugar del alcohol, en los apartados a) y b) 3, los



medios siguientes: Según *Günther*, alcohol absoluto + 3 % ClH , durante 10 segundos, luego alcohol absoluto. Según *Nicolle*, alcohol absoluto + 10-30 % de acetona, en volumen (*Nicolle* recomienda violeta de genciana fenicado con agua fenicada al 1 % y solución de iodo-iodurada 1 de I + 2 IK + 200 agua).

Toman el Gram, esto es, *quedan* teñidas en azul-negro después de tratar por el alcohol: el b. anthracis, el del tétanos, el tuberculoso y el de la lepra (para éste la coloración resulta apropiada sólo en el caso de tener seguridad de no haber otras bacterias en la preparación), de la difteria, mal rojo del cerdo, septicemia de las ratas, el b. de la gangrena gaseosa, estreptococos y estafilococós pyogenes, el pneumococo de Fraenkel, micrococus tetragenus, actinomices, levaduras, b. de la patata y otros varios (N. B. Prolongando mucho la acción del alcohol se decoloran también muchas de estas bacterias, especialmente en cultivos viejos).

No puede emplearse el método Gram (porque las bacterias se decoloran por el alcohol) en el reconocimiento del b. tífico, b. coli y sus semejantes, cólera de las gallinas y septicemia de los conejos, b. del edema maligno y b. Chauvoei (quedan teñidos algunas veces, véase además pág. 73 nr. VI) b. de la neumonía de Friedländer, b. de la peste bubónica, b. del muermo, b. de la influenza, b. Koch-Week, b. del chancro blando, espiroquetas de la sífilis y de la fiebre recurrente, gonococo y meningococos. En el b. del tétanos se tiñen tan sólo algunos bastoncillos.

Para observar el modo de comportarse los cultivos bacterianos respecto a la coloración Gram, se emplean siempre cultivos jóvenes y se toma para la observación un poco de materia de un cultivo joven de stafilococus pyog. aureus o de b. coli y se extiende sobre cubreobjetos y portaobjetos, como en las pre-



paraciones ordinarias; ejecutando el método perfectamente, quedan teñidos en negro-azulado los estafilococos, los colibacilos rojos. Los tratamientos con alcohol no han de ser breves pues de lo contrario quedan teñidas todas las bacterias por el Gram.

V. *Coloración de Weigert para cortes* (método llamado de la fibrina).

1. Teñir con litio-carmín (Carmín 2,5 disuelto en 100 de solución acuosa saturada de carbonato lítico,) o con solución de safranina en alcohol, $\frac{1}{4}$ a $\frac{1}{2}$ hora (también en fuchina fenicada Ziehl 1 + 4 Aq. dest.).
2. Enjuagar con agua o con solución de ClNa al 0,60 %.
3. Colorar con violeta de genciana en agua de anilina, 5-30 minutos; o según *Kühne* con la solución siguiente: cristal-violeta 1, disuelto en 10 de alcohol absoluto; una parte de ésta se diluye en 10 de ag. dest. + 2 gotas de ClH.
4. Enjuagar en solución de ClNa al 0,6 %.
5. Pasar los cortes a un portaobjetos y de secarlos con papel de filtro.
6. Tenerlos 1-2 minutos en solución iodoiodurada.
7. Desecar cuidadosamente con papel de filtro.
8. Decolorar con anilina, hasta que ésta no se tiña. Se comprueba la coloración de los cortes con el microscopio.
9. Separar la anilina con xilol. Incluir; bacterias azul violeta, fibrina, azul obscuro, tejidos rojo.

VI. Según *Claudius* (Ann. Past. 11, 1897): equivalente a la coloración Gram (pág. 70) sólo que en lugar de la solución de iodo iodurada, emplea una acuosa saturada de ácido pícrico, diluída en su volumen de agua. Diferenciar luego en alcohol o cloroformo. Tiñe en negro azulado los bacilos del edema ma-



ligno y de la gangrena bovina, no tiñe el del tétanos; por lo demás actúa como el Gram.

Solución de picrocarmín, para teñir por contraste los tejidos

- a) *Preparada según Friedländer:* disuélvase 1,0 de carmín en 50,0 de agua destilada + 1,0 de amoníaco, añádase solución acuosa saturada de ácido pícrico, hasta que el precipitado que se forma no desaparezca al agitar. Añadiendo entonces un poco de amoníaco se redisuelve aquél. Para impedir el desarrollo de microorganismos en la solución, conviene siempre añadirle algunas gotas de ácido fénico. Filtrese antes de emplearla. Estable.
- b) *Según Weigert:* digiérase 2 de carmín en 4 de amoníaco durante 24 horas. Añádase luego 200 de solución acuosa concentrada de ácido pícrico, y a las 24 horas, ácido acético gota a gota, hasta que se forme precipitado. Luego se añade amoníaco también gota a gota hasta redisolución.

Coloración de cápsulas

Muchas cápsulas de bacterias pueden teñirse en azul violeta pálido o en rojo, tratándolas sobre las preparaciones en cubre-objetos, con las soluciones de Löffler o de Ziehl (v. págs. 65 a y 65 c) durante largo tiempo y en caliente. Es mejor observar en agua, que en aceite o bálsamo del Canadá, porque, en este último caso, las cápsulas aparecen confusas.

Métodos especiales de coloración:

- a) *Segun Weidenreich-Hamm.* C. B. I. Or. 43, página 287. Se hace la preparación en una gota de



suero. Se fija con ácido ósmico (pág. 55) a lo más durante 30-40 segundos. Luego se tiñe con la solución de Giemsa (v. parásitos de la malaria) o con azul de metileno.

- b) Según *Johns*: Teñir medio min. con sol. de violeta de genciana al 2 % y calentando ligeramente. Lavar con agua. Decolorar con acético al 1-2 % durante 6-10 segundos; lavar con agua y observar por inmersión en la misma.
- c) Según *Klett*: Teñir con sol. alcohólica de azul de metileno diluída en agua al 1 : 10 y calentando a ebullición. Lavar con agua caliente. Coloración de contraste, tiñendo 5 segundos con solución de fuchina preparada como el azul de metileno. Lavar. Bacilos azules, cápsula rosa con el contorno rojo.
- d) Según *Nicoll* (para frotos y cortes).
 - 1. Teñir con la siguiente mezcla: Solución de violeta de genciana en alcohol de 95 % 10, y agua fenicada al 1 %, 100 partes.
 - 2. Lavar con alcohol absoluto + $\frac{1}{2}$ volumen de acetona. Lavar con agua, para frotos; con alcohol absoluto, aceite, etc., para cortes.
- e) Método de *Bunge* para teñir cirros. (v. pág. 78) coloración *Giemsa* (v. malaria) y otros métodos, pág. 83.

Coloración de esporas

Las esporas se tiñen con dificultad a causa de su envoltura resistente, efectuándolo sólo por una maceración prolongada o calentándolas breve tiempo con buenas soluciones colorantes. Dan buenos resultados los procedimientos siguientes:

- a) De *Möller*:

1. Tratar los frotos (después de fijar) 5 segundos hasta 10 minutos, con ácido crómico al 5 %. La duración debe ensayarse en cada especie bacteriana.
2. Enjuagar con agua.
3. Teñir con fuchina anilizada o fenicada, durante 1 minuto y en caliente.
4. Decolorar con SO_4H_2 al 5 % durante 5 segundos.
5. Enjuagar con agua.
6. Teñir por contraste con azul de metileno, lavar, etc.

Antes de tratar por el ácido crómico, puede tenerse la preparación en cloroformo 2 minutos, para separar de las esporas gotitas de grasa retenidas, etc. Luego lavar con agua.

Según *Aujesky* (C. B. I. 23, pág. 329) se sumergen los frotos desecados al aire y no fijados, en ClH al $\frac{1}{2}$ % en caliente, durante 3-4 minutos, se fijan y se tiñen como en los *nr.* 3-6 anteriores.

Según *Orszag* (C. B. I. Tom. 41, pág. 397). Se pasa el material bacteriano, a una gota de una mezcla de: 4 partes de sol. de salicilato de sosa al $\frac{1}{2}$ % y 1 de ácido acético al 5 %, se deja secar al aire, se fija en la llama y se trata como en *b)* 3-6 (en el *nr.* 4 emplear SO_4H_2 al 1 % o NO_3H al 3 %).

Coloración de cirros

(Para la observación de los cirros en bacterias vivas véase la iluminación sobre fondo oscuro, página 6).

Se toma el material bacteriano de cultivos sólidos, no de líquidos, (preferibles en particular, los cultivos jóvenes en agar) después de comprobar en gota sus-



pendida si presentan movilidad. Las bacterias que han de teñirse, deben estar aisladas cuanto sea posible y contener interpuestos pocos fragmentos del medio de cultivo, lo cual se consigue del modo siguiente: Se disponen seis cubre-objetos perfectamente limpios y se coloca una gota de agua sobre cada uno de ellos, se pasa un poco de materia al primero, de éste, un indicio al segundo, de éste al tercero y así sucesivamente. O bien, se pone un poco de materia en una gota de agua sobre un porta-objetos y, de éste, se pasa un indicio a una gota grande de agua, a la que se han añadido una o dos öses de solución de ácido ósmico; con estas gotas se preparan los cubre-objetos. O bien: se pone en un tubo de ensayos con solución de CINa al 0,8 %, una pequeña cantidad de bacterias, se pasan gotas de éste a los cubres, se extiende sin frotarlo mucho, se deja desecar al aire y se fija por medio de pasos a la llama.

Los cubres deben estar perfectamente limpios. (Modo de limpiar, v. pág. 8.)

A. Coloración de cirros según Loeffler

1. Poner en maceración los cirros sobre un cubre-objetos en la solución mordiente que se indica luego. Calentar, hasta que se desprendan vapores, $\frac{1}{2}$ -1 minuto.
2. Lavar la preparación con un chorro fuerte de agua. Separar cuidadosamente el mordiente en los bordes (eventualmente con papel de filtro) y en la superficie.
3. Lavar con alcohol, hasta que solo aparezca teñida la porción donde están los microorganismos.
4. Teñir con fuchina anilina (Es conveniente añadir a la solución preparada según la pá-



gina 65 b) 1 % o más de una solución de NaOH al 1 % hasta que empiece a precipitarse azufre o sea hasta que aparezca un enturbiamiento —prepárese de nuevo cada vez!) en caliente.

5. Lavar con agua.

Como mordiente, se emplea una mezcla de 10 cc. de solución de tanino al 20 %, 5 cc. de sol. de sulfato ferroso saturada en frío, 1 cc. de sol. acuosa o alcohólica de fuchina (o violeta de metilo). Este mordiente es muy apropiado, según Loeffler, para teñir los cirros del *spirillum concentricum*; para el b. tífico es necesario una adición de 1 cc. de NaOH al 1 %, por cada 16 cc. de mordiente, para el b. subtilis 28-30 gotas, y para el b. aedamatis malignae 36-37 gotas de la sol. alcalina. Para teñir los cirros del v. del cólera y los de *spirillum rubrum*, deben añadirse, por cada 16 cc. de mordiente, $\frac{1}{2}$ -1 gota y 9 gotas respectivamente de sol. de SO_4H_2 de la misma normalidad que la sol. alcalina anterior.

Según *Nicolle* y *Morax* puede prescindirse de la adición de ácido o álcali, si se hace actuar el mordiente 3-4 veces durante 10 segundos, calentando hasta que se desprendan vapores (que no hierva) y lavando cuidadosamente con agua entre cada dos tratamientos. En lugar de lavar en el nr. 3, con alcohol, puede hacerse con agua.

Se evita la formación de precipitados en la preparación, lavando con mucho cuidado. Es también conveniente al macerar y teñir, poner un pedazo de papel de filtro sobre la preparación, y encima de él, la solución colorante.

Modificación de Bunge:

- 1 Macerar con la siguiente solución: 30 cc. de solución acuosa concentrada de tanino, 10 de cloruro férrico al 5 % y 8 cc. de solución acuosa



saturada de fuchina. El mordiente debe dejarse en reposo por lo menos algunos días. Antes de usarla, se le añade agua oxigenada gota a gota hasta que esté de color rojo pardo (proximamente de 14 gotas de H_2O_2 al 3 %, por cada 5 cc. de mordiente). Luego se filtra la solución sobre los cubre-objetos y debe hacerse actuar (en caliente) de 1-5 minutos. (El mordiente adicionado de H_2O_2 se conserva inalterado muy poco tiempo.)

2. Lavar con agua.
3. Teñir con violeta de genciana fenicada (véase pág. 66 d) calentando ligeramente.
4. Lavar con agua, desecar, montar en bálsamo.

Puede emplearse como mordiente para todas las bacterias, sin necesidad de adición alguna.

También se tiñen las cápsulas, especialmente si antes que el mordiente, ha actuado el ácido acético al 5 %, $\frac{1}{2}$ -1 minuto lavando luego con agua.

Modificación de *Coerner-A. Fischer*.

1. Macerar con la solución siguiente, durante 1 minuto y en caliente, pero sin hervir: 2 gr. de tanino, 20 gr. de agua, 4 cc. sol. de sulfato ferroso, (1 : 2) + 1 cc. sol. alcohólica saturada de fuchina.
2. Lavar con agua.
3. Teñir con fuchina anilinada o fenicada o con sol. acuosa saturada de fuchina.
4. Lavar con agua, desecar, incluir.

Aplicable a todas las bacterias sin otra adición ulterior.

B. Coloración de cirros según Peppler (C. B. I. 29, p. 345¹).

1. Macerar en frío durante 1-5 minutos, con la solución siguiente: se disuelven al baño maría 20



de tanino en 80 de agua, se deja enfriar a 20° y se le añaden en pequeñas porciones 15 cc. de una sol. al 2,5 % de ácido crómico exento de sulfúrico, agitando bien, se deja luego 4-6 días a la temperatura ordinaria y se filtra por un filtro doble. Se conserva a la temperatura ordinaria. Debe filtrarse siempre antes de usarla.

2. Lavar mucho con agua.
3. Teñir 2 minutos con sol, de violeta de genciana fenicado (v. pág. 70 a), sin calentar.
4. Lavar mucho con agua y desecar.

C. Coloración de cirros según van Hermengen

1. Se tratan los frotos durante $\frac{1}{2}$ hora en frío o 5 minutos a 50-60°, con una mezcla de: 1 parte de ácido ósmico al 2 % y 2 partes de sol. de tanino al 10-25 %, a la que se añade 4-5 gotas de ácido acético %. La mezcla debe estar preparada algunos días antes de usarla.
2. Lavar con agua destilada, luego con alcohol absoluto.
3. Humedecer en sol. de NO_3Ag al 0,25-0,50 (-1,0) %, durante algunos segundos.
4. Sin lavar, se tratan durante algunos segundos por la siguiente solución: ácido gallico 5,0, tanino 3,0, acetato sódico fund. 10,0 ag. dest. 350.
5. Repetir el núm. 3, moviendo continuamente la preparación, hasta que el líquido empiece a ennegrecerse.
6. Lavar con mucha agua. Si la coloración no aparece bastante intensa, repetir desde el 4 al 6.
7. Secar, montar en bálsamo.

Las bacterias quedan pardo negruzcas, los cirros negros. A ser posible, trabájese con luz solar.



D. Coloración de cirros según Zettnow

Klin. Jahrb. tom. XI pág. 379 (indicaciones anteriores Zschr. f. Hyg. Bd. 30 pág. 95.)

1. *Preparación de los frotos* como en el procedimiento del a. ósmico (v. pág. 77).
2. *Maceración.* Fijar los cubres a la llama, colocarlos con la cara preparada vuelta hacia abajo, en pocillos de cristal, en abundante mordiente y ponerlos sobre una plataforma de hierro caliente a 100° durante 5-7 minutos. *Preparación del mordiente:* Se disuelve 10 de tanino en 200 de agua caliente a 50-60°, se le añade 36-37 cc. de una solución de 2 gr. de tártaro estibiado en 40 de agua, y se calienta hasta tener disuelto el precipitado. Si el mordiente al enfriarse se enturbia mucho (se pone lechoso—hacer la prueba en tubo de ensayos) se añade un poco de tanino, si por el contrario queda transparente, se le añade 1 cc. de sol. de tártaro. El mordiente no debe formar sedimento, y calentándolo ha de quedar del todo transparente. Añadiendo un poco de timol se conserva mejor. Debe emplearse en caliente y del todo claro.
3. Se dejan enfriar los pocillos hasta que el mordiente empieza a enturbiarse; luego se lavan bien con agua.
4. Se ponen sobre el portaobjetos 3-4 gotas de sol. de etilaminato de plata y se calienta hasta que desprenda muchos humos y que los bordes de la preparación (sólo los bordes!) se pongan negros. *Etilenaminato de plata*, preparación: 2-3 gr. de sulfato argéntico, se agitan fuertemente en 200 de agua, hasta obtener una solución saturada. Si diluye una porción de éste en

6.—Téc. BACTER.



su volumen de agua en un tubo de ensayo y se añade sol. de etilamina (comercial) al 33 %, hasta que el precipitado que empieza a formarse, se redisuelve bien. Inalterable, utilizable aunque se tiña lentamente en pardo.

5. Lavar con agua. Cirros negros, el fondo completamente transparente.



VI

Métodos especiales de investigación

para las especies más importantes de microorganismo patógenos y
algunos otros

1. *Bacillus Anthracis* (Carbunco)

Bastoncillos gruesos, inmóviles, dispuestos generalmente en rosarios más o menos largos. Se desarrolla en todos los medios ordinarios de cultivo. Se tiñe fácilmente. Los bastoncillos teñidos muestran contornos bien definidos rodeados a veces por un segundo contorno; no presenta este fenómeno, teñido por el Gram. Las esporas no se producen a menos de 18°, ni tampoco en el cuerpo animal, exigiendo para su desarrollo, humedad y contacto del aire.

Las cápsulas se producen, por regla general, sólo en los animales.

Coloración de cápsulas, según los métodos de la pág. 74. Además, se ponen de manifiesto aquéllas, tiñendo con safranina (se disuelven 3 gr. en 10 de agua destilada casi hirviendo y después de frío, se filtra) en caliente, o bien se tiñe con violeta de genciana-formalina (sol. saturada en frío de colorante, en formalina, filtrada; los frotos sin fijar se tiñen en frío en 10 segundos). Observar en agua. La formación de cápsulas en el b. a., contribuye algunas veces a dife-



renciarle de otros bacilos análogos, en los cadáveres de animales en descomposición, pero nunca basta sin embargo, por sí solo, para diagnosticar, sin obtener resultados positivos en cultivos e inoculaciones en animales.

Su presencia en éstos puede comprobarse con alguna seguridad al microscopio, únicamente cuando se trata de material no putrefacto.

Es más seguro el análisis por cultivos e inyecciones. Estas últimas fracasan a veces aun siendo los cultivos positivos. Para las inyecciones, los animales mejores son las ratas blancas y los cobayas (inyección subcutánea); examínese la sangre y en caso de resultado negativo, el sitio de la inyección (edema).

Si los cultivos y las inyecciones son negativos, puede dar aun buen resultado el *método de la precipitación* (reacción *Ascoli*): 2-3 gr. del material (sangre; bazo) finamente pulverizados con arena, se mezclan con 10 cc. de cloroformo y se dejan 5 horas a la temperatura ambiente; se vierte luego el cloroformo, se añaden al residuo 5 cc. de sol. de CINa al 0,85 % y se filtra a las 6-12 horas. O bien, se emulsiona el material en 5-10 veces su volumen de sol. CINa , se hierve varias veces y se filtra después de frío. Se vierte con cuidado un poco del líquido filtrado en un tubo de ensayo estrecho que contiene suero carbuncoso muy rico en precipitinas (lo vende L. W. Gans, Oberrursel-Francfort a. M.) La presencia de carbunco se comprueba por la formación de un anillo turbio en la zona de separación, siempre que en el suero normal no ocurra lo mismo (para otros detalles v. C. B. I. Or. 58, pág. 63. Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk. 38, nr. 3; para los aparatos v. Zeitschr. f. Immunitätsforschung, 11, página 103).

Si la materia animal sospechosa no puede ser examinada inmediatamente, puede conservarse vivo el



bacilo desecando el material que lo contiene (sangre de las venas auriculares o del cuello o pulpa de bazo) en capa gruesa sobre portaobjetos, papel de filtro o placas de yeso. Para examinarlo debe reblandecerse o rasparse.

Para examinar el pelo etc. debe lavarse aquél con caldo alcalino, se calienta éste media hora a 80° (con lo cual las esporas del carbunco sobreviven todavía) se centrifuga y el sedimento se emplea en las inyecciones y cultivos.

Obtención de hilos esporulados: Se practica como prueba en las prácticas de desinfección (v. págs. 51 y 52 y núms. 8 y 9). Resistien por regla general el vapor de 100° durante 2-5 minutos. El raspado de cultivos sobre agar o patatas, en los que el microscopio ha puesto de manifiesto esporas bien desarrolladas, se deslie con agua estéril y luego se toman hebras de seda de 1-2 cm. de largo, esterilizadas (seda Turner nr. 4-7) y se humedecen en la suspensión, guardándolas en seguida en cápsulas dobles esterilizadas, desecándolas en la obscuridad dentro de un desecador. Después de secas se pasan dentro de tubitos de ensayo, operando en la obscuridad (debe tenerse mucho cuidado durante esta manipulación porque existe el riesgo de inhalar las esporas); para comprobar su resistencia es preferible la siembra en caldo glucosado al 3 %, con 5 % de suero bovino o equino.

2. Bacilo de la tuberculosis

Entre los medios de cultivo usuales son aplicables el b. T.: el suero sanguíneo (preferentemente obtenido por sangría directa); el agar glicerinado (4 % de glicerina, optimo); patata glicerinada (cuñas v. página 27, colocadas sobre tubitos bastante largos coci-



das en agua glicerinada al 4 %, y rociadas luego con ésta) caldo glicerinado (se desarrolla sólo en partículas que sobrenadan en la superficie). Cultivos a 37°; desarrollo muy lento. Debe evitarse la desecación con dedales de goma (v. pág. 37) u otro de los medios indicados en cap. X, B, 2, 4, 5. No se desarrolla sobre gelatina, agar peptonado, etc., ni a la temperatura ambiente. Inmóvil.

Se emplean como medios especiales de cultivo (desarrollo abundante y a los 8 días); agar Heyden de *Hesse* (v. pág. 90) y medios a base de *seso* según *Ficker*: Se mezclan sesos finamente picados con agua $\overline{aa}$, se calienta a ebullición durante media hora, agitando continuamente, se cuele luego, hasta que quede en el colador una ligera papilla. Se mezcla ésta sin neutralizar, con sol. al 2 % de agar, en agua destilada $\overline{aa}$, se le añade 3 % de glicerina, se esteriliza, etc. Se reparte en tubos, se mezcla bien y se coagulan rápidamente antes que se separen en capas el seso y el agar.

Cultivos del bacilo procedente de los tejidos, esputos, etc., por medio de inoculaciones animales (página 93) o por siembra directa (en presencia de otras bacterias, según B 1 b, pág. 91). En los animales de raza bovina sospechosos de tuberculosis, se extrae la mucosidad mediante una espátula especial o bien se introduce una sonda en la tráquea y al través de ella se hace llegar hasta los bronquios una torunda de algodón sujeta al extremo de un alambre; en los sospechosos de tuberculosis purulenta debe extraerse el nódulo.

Métodos de coloración para el b. tuberculoso

Los b. tuberculosos se tiñen con dificultad, pero una vez teñidos, retienen muy fuertemente el colo-



rante. En los siguientes métodos se reconoce el b. T. (y algunos otros parecidos los llamados *ácido-resistentes*; para su diferenciación, v. pág. 94 y sigs.) por el primer colorante, mientras que las demás bacterias se tiñen con los colorantes empleados para el contraste.

a) Método de *Ehrlich-Ziehl-Neelsen*.

Para frotos:

1. Teñir con fuchina anilinada o fenicada durante 2 minutos, hirviendo.
2. Decolorar 2-5 segundos con SO_4H_2 al 5 % o con NO_3H al 25 %.
3. Lavar con alcohol al 70 % hasta que la preparación aparezca incolora (si esto no se efectúa bastante rápidamente, se repiten los núms. 2 y 3).
4. Teñir con sol. acuosa saturada de azul de metileno, o con azul de metileno Loeffler (pág. 65) 1 + 3 de agua, 5-10 segundos.
5. Lavar con agua.

Para cortes:

1. Teñir con fuchina anilinada (no debe emplearse fenicada, porque las preparaciones aparecen sucias), 15 minutos hasta 24 horas.
2. Decolorar 10 segundos, con SO_4H_2 5 % o con NO_3H al 20 %.
3. Lavar con alcohol al 70 % hasta que la preparación aparezca incolora (para obtener esto más de prisa se puede repetir el tratamiento rápidamente, 2 o 3 veces.)
4. Teñir con azul de metileno, o mejor con el de *Loeffler* (pág. 65) 1 + 3 agua, 2-5 minutos.
5. Lavar con a. acético al $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ %.
6. Deshidratar en alcohol absoluto. Aclarar en aceite de cedro, etc.

B. tuberculoso rojo, los tejidos y las demás bacterias azules.

Para frotos y cortes puede emplearse asimismo en



el nr. 1, violeta de genciana anilinado y luego en el 2, NO_3H al 25 % y en el 4, soluciones diluídas de fuchina-safranina o de pardo de Bismarck. En este caso el b. tuberculoso aparece teñido en azul y los tejidos en rojo o pardo.

b) *Procedimiento de Fränkel y Gabbet.*

Para frotos:

1. Teñir con fuchina anilizada o fenizada 2 minutos, en caliente.

2. Decoloración y coloración de contraste simultáneo, empleando una mezcla de 30 de alcohol, 50 de agua, 20 de NO_3H y azul de metileno a saturación (o bien 10 de SO_4H_2 , 30 de agua destilada + azul de metileno a saturación).

3. Lavar con agua, o bien:

1. Teñir con violeta de genciana anilizada o con violeta de metilo 2 minutos, en caliente.

2. Decolorar y teñir por contraste ($1\frac{1}{3}$ -2 minutos) empleando sol. de 70 de alcohol, 30 de NO_3H + pardo Bismarck a saturación.

3. Lavar con agua.

El procedimiento b) tiene sobre el a) la desventaja de que no pueden verse bien todas las fases de decoloración y coloración de contraste; además algunas veces se tiñen otros bacilos acidorresistentes, no sirviendo por tanto para un diagnóstico seguro.

c) *Método de Pappenheim. Para frotos:*

1. Teñir con fuchina fenizada (pág. 65) 2 minutos calentando a ebullición.

2. Sin lavar, se trata 1 minuto con la sol. siguiente: coralina 1, sol. saturada de azul de metileno en alcohol absoluto 100, glicerina 20.

3. Lavar con agua. Desecar. Incluir.

Respecto del método a) tiene el inconveniente de que la decoloración y la coloración de contraste no pueden seguirse bien en todas las fases.



d) *Método de Kronberger* (Beitr. z. Klin. der. Tub. 16, pág. 157). *Para frotés:*

1. Teñir con fuchina fenicada (pág.) hasta formación de vapores.
2. Decolorar con a. nítrico al 15 %.
3. Lavar con alcohol al 60 %.
4. Teñir con tintura de yodo diluída al 1 : 4 en alcohol de 60, algunos segundos.
5. Lavar largo rato, desecar.

Los b. T. aparecen teñidos con unos corpúsculos rojo oscuros o negros, que a veces aparecen libres (gránulos de *Much*). Otras bacterias y tejidos quedan sin teñir.

Investigación del b. tuberculoso en los esputos

(*Investigaciones parecidas en exudados, orina, leche y semejantes:*

A.—En el *análisis microscópico* se empieza por hacer unas preparaciones por *frotamiento*. En el análisis de esputos, se extiende la secreción sobre un plato barnizado de negro (o en una cápsula de vidrio con el fondo negro) y se toma una partícula de la parte del esputo que aparezca más sólida, preferentemente los grumos amarillos purulentos, y se coloca sobre un cubreobjetos, se extiende uniformemente con la òse o bien se aplasta con otro cubre o con un portaobjetos y se fija y tiñe, según uno de los métodos antes citados. La orina, los exudados, el líquido cerebro-espinal obtenido por punción lumbar, etc., se centrifugan y se hacen preparaciones con el sedimento. Una preparación podrá considerarse bien teñida, únicamente cuando a excepción del b. T. nada (exceptúase, a lo más, una ligera coloración en los epitelios planos o en los contornos celulares) más queda teñido en el color empleado para su reconocimiento.



—Si después de examinar varias preparaciones, no se encuentra bacilo ninguno, se emplean los procedimientos para obtener germinación (B) o se hacen ensayos sobre animales (C).

B. *Procedimientos por multiplicación:*

1. *Procedimientos biológicos:* (Para el reconocimiento del b. tuberculoso en cultivos).

a) Multiplicación rápida del b. T. sobre medios de cultivo apropiados. *Siembras sobre Agar-Heyden*, según Hesse. Se disuelven 5 gr. de *alimento* Heyden en 50 de agua destilada, en un mortero y la solución obtenida, se añade a otra de 5 de ClNa , 30 de glicerina, 10-20 de agar, 2 de sol. normal de CO_3Na_2 , en 950 de agua destilada, se hierve, agitándolo, durante 15 minutos y se filtra en caliente. Se reparte después de esterilizada en cápsulas Petri, se deja solidificar y se extiende una partícula (lenteja) del esputo (que en caso necesario se lava varias veces con agua estéril) en la superficie, en pequeños granos aislados. En este medio de cultivo, crecen muy rápidamente los bacilos a 37° , son abundantes ya a las 6-7 horas y a los 2-7 días forman colonias apreciables a simple vista (para preservar las placas de la desecación deben colocarse en cámara húmeda), mientras que el crecimiento de las demás bacterias del esputo es muy difícil. Se observa en preparaciones obtenidas por aplastamiento. Es un excelente procedimiento para un rápido diagnóstico, en esputos pobres en b. T. Para obtener cultivos puros es preciso *resemenbrar*. Se puede mezclar también el esputo con 5 veces su volumen, de la solución nutritiva de Heyden antes citada (sin añadir agar) y tenerlo 24 horas en la estufa a 37° , con lo cual se desarrollan los b. T., y luego se tratan según el procedimiento de sedimentación descrito, en la página 92, c.—*Siembras sobre agar-agua-glicerina*, según Hesse v. C. B. I. Or. 35, pág. 386.



b) Por disolución de todas las bacterias menos el b. T.

Tratamiento con la *antiformina* según *Uhlenhuth* (Arb. K. G. A. 32, pág. 158): se mezclan 20 cc. del esputo con 65 cc. de agua dest. estéril y 15 cc. de *antiformina* en una cápsula doble de unos 15 cm. de diámetro, puesta sobre fondo negro. A las 1-2 horas queda homogeneizado el esputo, acelerándose por la agitación. Se toman 10 cc. con una jeringa estéril, se centrifuga, se separa del sedimento, se agita éste con 10 cc. de sol. de ClNa a 0,8 %, se centrifuga otra vez y se repite el tratamiento. Del sedimento se toman 4-5 anillas y se siembran en tubos de suero coagulado en posición inclinada frotando bien; se siembran 6-8 tubos y puede emplearse suero con 4 % de glicerina. En el sedimento sólo quedan vivos los b. T., las demás bacterias han sido muertas y disueltas. La *antiformina* es una mezcla de sol. de hipoclorito sódico con sosa cáustica.

2. *Procedimientos por sedimentación*: (Seguidos en la investigación microscópica del b. T.—fluidificación de los esputos para conseguir que los b. T. se sedimenten o puedan separarse por centrifugación).

a) Con *antiformina* (v. más arriba Ib.). 1. Se agitan fuertemente durante cinco minutos, 2-10 cc. de esputo con doble o triple volumen de *antiformina* al 15 %, hasta conseguir homogeneización completa y empleando un frasco o un tubo de tapón esmerilado o mejor una probeta de seguridad de *Lentz* (C. B. I. Or. 70, pág. 108). 2. Hervir en un tubo de ensayo. 3. Centrifugar. 4. Decantar la *antiformina*. El sedimento se extiende sobre cubreobjetos con un poco de agua o mejor se añade albúmina, suero o esputo fresco para conseguir la adherencia. Fijar. Teñir.

b) Según *Loeffler* (D. l. W. 1910, nr. 43): Se hierve el esputo con un volumen igual de *antiformina*



al 50 %. 10 cc. de la mezcla se agitan en un frasco de cierre mecánico, con 1,5 cc. de una mezcla de 10 de cloroformo + 90 de alcohol. Centrifugar 15 minutos. Extraer el disco formado sobre el cloroformo, colocarlo sobre un portaobjetos, desecarlo con papel de filtro, y extenderlo entre dos cubreobjetos añadiéndole una gota de albúmina de huevo (que contiene 0,5 % de fenol). Después de fijar, tñase con fuchina fenicada, decolórese con alcohol absoluto + 3 % de ClH , lávesc con agua y tñase de nuevo con solución al 0,1 % de «verde malaquita crist. quim. puro» (de la marca Höchst).

c) Según *Sachs-Mücke* (M. m. W. 1907, pág. 988): Se añade al esputo agua oxigenada a dosis refracta (1 : 2 de esputo) que lo fluidifica con desprendimiento gascoso. Añadir luego alcohol hasta que desaparezca la espuma. Centrifugar. Hacer preparaciones con la espuma y el sedimento.

d) Según *Biedert-Mühlhauser-Czaplewski*: Agitar fuertemente durante 1 minuto el esputo + 2-4 volúmenes de sosa al 0,2 %, en una probeta cerrada con un tapón de goma, hasta fluidificación. Calentar luego en cápsula de porcelana, a ebullición y agitando. Añadir luego 1-2 gotas de fenoltaleína y neutralizar con ácido acético agitando fuertemente (sólo hasta que desaparezca el color rosado). Se deja sedimentar en una copa o se centrifuga después de añadir dos volúmenes de alcohol; con el sedimento se hacen preparaciones teñidas.

e) Según *Ellermann y Erlandsen* (Zschr. f. Hyg. Bd. 61, pág 219): Se mezclan 10-15 cc. de esputo con la mitad de su volumen de carbonato sódico al 0,6 %, en un tubo graduado que se tapa con un corcho y se deja en la estufa a 37° durante 24 horas. Se decanta el líquido, se centrifuga el sedimento y se decanta de nuevo. Se mezcla aquél con 4 veces su volumen de



sosa al 0,25 %, se agita con cuidado, se hierve, se centrifuga y se hacen preparaciones con el sedimento.

f) Según *Lange y Nitsche* (D. m. W. 1909, página 435): Se mezclan 5 cc. de esputo con 50 de potasa normal y se homogeneiza a 37°, agitando con frecuencia. Se añaden 50 cc. de agua corriente y se agita, luego 2 cc. de ligroína y se agita de nuevo hasta obtener emulsión espesa. Se calienta a baño maría a 60-65°, hasta que se separen bien las diferentes capas. Prepárense frotos con la capa de separación por debajo de la ligroína.

C. *Ensayos en animales.* El método es más lento que los a) y b) pero de resultado más seguro. Se hacen inyecciones subcutáneas (de preferencia cuando el material es rico en otras bacterias; en caso de hacerse las inyecciones con excrementos humanos o de animales, convendrá el tratamiento previo con antiformina según B. I. b., pág. 91), intraperitoneales o intramusculares (en las patas traseras) con el material tuberculoso; los cobayas mueren la mayor parte en 4-8 semanas, hallándoseles abundantes nódulos tuberculosos en el hígado y en el bazo, menos en los pulmones y se nota caseinificación de los ganglios linfáticos. En los nódulos, que deben examinarse siempre al microscopio para evitar la confusión con enfermedades análogas, se encuentran numerosos b. T. Para las siembras se aplastan los nódulos entre dos portaobjetos estériles y se siembran muchos fragmentos, del tamaño de una cabeza de alfiler por lo menos, sobre suero sanguíneo coagulado. Germinación v. pág. 86. Empieza a notarse claramente a los 8-14 días; la contaminación con otras bacterias inutiliza los cultivos.

En caso de existir el b. T., 2-3 semanas después de la infección, se encuentran ya en la mayor parte de los casos los ganglios linfáticos del punto inyectado con infarto duro y en los órganos internos se notan clara-



mente pequeños nódulos con b. T. Para acelerar el diagnóstico puede matarse el animal al cabo de dicho tiempo, sin esperar a que muera. Resulta conveniente inyectar siempre 2-3 animales con el mismo material y se mata uno, dejando los otros hasta el final.

Los ensayos en animales *sirven de diagnóstico diferencial con otras bacterias ácido-resistentes*: Los bacilos de la lepra y del esmegma (éste en la orina, véase más adelante) no son patógenos para los animales. En la manteca, en la leche, en el estiércol, en ciertas plantas y muchas veces también en el cuerpo humano, (p. ej. en la gangrena pulmonar), se presentan bacilos, que se tiñen como el de la tuberculosis y son, como éste, patógenos para los cobayas, diferenciándose sin embargo por sus cultivos (crecimiento rápido en todos los medios de cultivo y aun a la temperatura ordinaria.)

Los bacilos procedentes de la tuberculosis bovina (tipo bovino) se distinguen de los de la humana (tipo humano) por su forma más corta y gruesa, por ser más difíciles de germinar, formando sobre los medios líquidos, colonias en forma de película delgada apenas rugosa, que no llega a las paredes de vidrio y por ser más infecciosos (en los conejos y terneras inoculados produce no sólo reacciones locales, sino tuberculosis en general). Los bacilos de la tuberculosis en los pájaros y animales de sangre fría se distinguen también por otros caracteres especiales.

3. Bacilo del esmegma

Se encuentra en las secreciones prepucial y vulvar, en la orina (las últimas porciones de ésta, extraídas con la sonda después de limpiar el aparato genital externo, están casi exentas de bacilos) en los pliegues



del ano, en el cerumen de las orejas, y circunstancialmente en otras regiones del cuerpo. Más cortos y finos que el b. T., muy abundantes, situados en los epitelios. En cambio, el b. T. en la tuberculosis renal, se encuentra generalmente formando montones aislados sin células.

Ensáyese la *siembra sobre suero sanguíneo*.

Coloración: Son ácido-resistentes, de modo análogo a los bacilos tuberculoso y de la lepra, pero con menos intensidad. Para distinguirlo del b. T., háganse ante todo los ensayos sobre animales (v. página 93 C); luego el método de acumulación, pág. 91, 2 a (la antiformina al 15 % disuelve el b. del esmegma al cabo de una hora y no disuelve en cambio el b. T.) se distingue también por los métodos de coloración que tiñen únicamente el b. T. (v. pág. 91 c y d) así como por los siguientes: 1. Teñir con fuchina fenicada hirviendo 2 minutos. 2. Lavar con agua, desecar. 3. Decolorar con alcohol absoluto + 3 % ClH, 10 minutos. 4. Lavar con agua. 5. Teñir por contraste en una mezcla de volúmenes iguales de sol. alc. de azul de metileno y agua. Los b. T. se tiñen en rojo, los del esmegma azules.

4. Bacilo de la lepra

Hasta ahora no ha sido posible el *cultivarlo* con seguridad.

Se tiñe del mismo modo que el b. T., aunque los tratamientos con alcohol y ácidos han de ser más cortos. Los b. de la lepra se encuentran más aglomerados en los tejidos enfermos de lepra, que el b. T. en los tejidos tuberculosos y se tiñen más fácilmente que éstos. Diferenciación entre ambos según *Baumgarten*:



1. Teñir con sol. alcohólica diluída de fuchina, 6-7 minutos (5-6 gotas de sol. alc. saturada en un vidrio de reloj lleno de agua.)

2. Decolorar $\frac{1}{4}$ de minuto con alcohol 10 + 1 de NO_2H .

3. Lavar con agua. Para los cortes en lugar de ésta, alcohol absol. y aceite de cedro. En caso necesario, coloración de contraste con azul de metileno diluído.

Por esta breve coloración, quedan ya teñidos los b. de la lepra y el b. T., no. Además se diferencian por los ensayos sobre animales (v. pág. 93 C.); el b. de la lepra no es patógeno para éstos.

En casos sospechosos de lepra, recientes, es recomendable el análisis de la mucosidad nasal además de las partes del cuerpo enfermas. En caso necesario se procede a la acumulación de modo análogo al empleado para los b. T. (v. pág. 91, 2 a).—v. *Unlenhuth*, Lepra, T. IX, n.º 2).

5. Bacilo del muermo

Debe tenerse mucho cuidado porque existe peligro de infectarse. Los permisos para trabajar con los cultivos de muermo son limitados.

Cultivos a 37° sobre suero, agar, patatas (sobre estas últimas forma una capa parecida a miel que luego se vuelve rojo-parda). Le conviene la adición de glicerina (4 %) y reacción del medio ligeramente ácido. Inmóvil; forma bastoncillos granulados, cortos cuando jóvenes y más largos los antiguos; los granulados se tiñen por el método de *Neisser*, v. pág. 101.

La coloración es un tanto difícil, no toma el Gram.



Son preferibles las soluciones de la pág. 65 a, c, f, g, el método de *Loeffler*, v. tripanosomas 5, n.º 39 y el de *Giemsa*, v. malaria. Para cortes se aplican los métodos de la pág. 67 a, d, e, f; en el procedimiento a, puede añadirse tropeolina oo al ácido acético hasta que tome color de vino blanco, persistente.

El *reconocimiento* en los materiales procedentes de hombres o animales sospechosos o muermosos se efectúa preferentemente por los ensayos sobre animales. Los cobayas inyectados intraperitoneal o subcutáneamente (en caso de material poco puro) mueren a los 10-12 días; los nodulillos de los órganos internos y el pus de los ganglios linfáticos contienen el bacilo en cultivo puro. El edema rápido de los testículos en los cobayos machos inyectados intraperitonealmente (método de *Strauss*), no es completamente específico para el muermo. Los murciélagos inyectados subcutáneamente mueren a los 3-4 días, pero debe tenerse en cuenta que en caso de estar el material impuro, padecen, con más facilidad que los cobayas, de infecciones secundarias.

El *diagnóstico del muermo*, además de los cultivos, puede hacerse también por las pruebas siguientes:

- a) *Ensayo de la malleína* (inyección subcutánea y oftalmorreacción): La malleína puede adquirirse con las instrucciones para su empleo del *Sächs. Serumwerk* de Dresde.
- b) *Ensayo de aglutinación del suero*: Son necesarios buenos cultivos aglutinables. Para ello se matan cultivos sobre agar de dos o tres días, calentándolos tres horas a 60° y se suspenden en sol. de CINa al 0,85 % + 0,5 % de fenol. Debe ensayarse la concentración de la suspensión con un suero comprobado; conservado en la nevera, resulta utilizable 4-6 semanas. El suero de caballos muermosos aglutina ya a la concentración de 1:1000



y menos aún, el de caballo sano sólo actúa 1:400. Para la técnica v. b. tífico, pág. 118.

- c) *Separación de complementos en el suero*: Reacción análoga a la de *Wassermann* (v. Espiroqueta de la sífilis). Como antígeno se usa extracto de b. del muermo. Del amboceptor hemolítico se emplea el doble de la concentración activa, del complemento la cantidad mínima capaz de disolver los eritrocitos en presencia de aquél.
- d) *Método de la coagulación y método K. H.*: (Zeitschr. f. Vet. -Kunhe. 1915, núm. 10. 1916, núm. 12).
- e) *Método de la precipitación*: Análogo al caso del b. del carbunco (Arch. f. wiss. u. prak. Tierheilk. 1909, p. 323).

6. Bacilo del chancro blando

Siembras posibles sobre agar sangre (v. cap. VII, 1) preferentemente sangre humana (no siempre dan resultado). Las colonias se desprenden íntegras. Forma largas cadenas en el agua de condensación. Los cultivos mueren a los pocos días.

Se tiñe por los métodos ordinarios, no toma el Gram; en los cortes debe decolorarse con cuidado. Dan buenos resultados el método de tanino de *Nicollé* (v. pág. 68 e) y el de doble coloración de *Unna-Pappenheim*: teñir 5-10 minutos en una mezcla de verde metileno 00 crist. (Dr. Grübler-Leipzig) 0,15 + pironina 0,25 + alcohol de 96, 2, 5 + glicerina 20,0 + agua fenicada al 0,5 %, 100. Lavar con agua (los cortes: con alcohol brevemente, desecar, lavar con xilol, incluir). Los tejidos aparecen de color azul verdoso, los bacilos rojos.



7. Bacilo de la difteria

Los *cultivos* se obtienen a más de 20°, con mayor rapidez a la temperatura fisiológica. Desarrollo optimo sobre suero de sangre según *Loeffler* (v. pág. 25), especialmente cuando se ha preparado con sangre de carnero. Sobre agar ordinario, agar glicerinado, y el agar suero indicado en la pág. 100 se desarrolla poco y da formas poco características.

Para la coloración resulta preferente la sol. alcalina de azul de metileno según *Loeffler* (v. pág. 65). Toma también el Gram (no debe decolorarse demasiado). Coloración de gránulos según pág. 101. Inmóvil.

Diagnóstico de la difteria

Para la *toma en la garganta del material que se examina*, v. cap. VII, 3. Los frotese tiñen con azul de metileno de *Loeffler* (pág. 65) y toman el Gram. Los b. diftéricos aparecen en forma de bastoncillos delgados agrupados en forma de V, o cruzados. En caso necesario se tiñen los gránulos (pág. 101). El diagnóstico no resulta seguro del todo por las preparaciones de frotese. (La presencia del b. fusiformis y de espiroquetas delgadas, en cultivo casi puro, indican que se trata de la angina de *Plaut-Vincent* o de una estomatitis ulcerosa. No obstante háganse siempre cultivos de b. d.)

Los cultivos se hacen por siembra fraccionada (pág. 37) sobre suero de sangre según *Loeffler*, en tubos o en cápsulas Petri (v. pág. 25). (N. B. Antes de utilizar una partida de suero para el diagnóstico, debe examinarse en algunos tubos su valor nutritivo sembrándolos con cultivo puro de b. d.). Para la



comprobación en caso de existir pocos bacilos, *Neisser* y *Schuster* aconsejan el método siguiente: (V. G. M., t. 3 núm. 6, p. 1): se enjuaga la sonda en el agua de condensación del tubo de suero y luego se humedece con ella cuidadosamente la superficie del medio. La sonda se deja en el tubo; al cabo de seis horas se extiende de nuevo el agua sobre el suero, inclinando el tubo con cuidado. La germinación tiene lugar a la temperatura fisiológica (en caso de necesidad pueden llevarse los tubos en el bolsillo interior del chaleco). Los b. d. crecen rápidamente y en abundancia sobre el suero de *Loeffler*, en formas características que se distinguen bien del pseudo-bacilo de *Hofmann-Loeffler* y del b. de la xerosis también por su forma y además por el tamaño de las colonias (las del b. d. son mucho mayores).—Además del suero de *Loeffler* pueden utilizarse los siguientes medios de cultivo, aunque son menos eficaces:

1. *Agar glicerinado*: Las colonias quedan pequeñas y son más difíciles de encontrar. A causa de su forma pueden confundirse con varias especies de pseudobacilo.
2. *Agar suero según Tochtermann*: Se mezcla sol. de agar al 2% + 1% de peptona, con 0,5% de ClNa, 0,3 a 0,5 de glucosa, se filtra y se le añade un volumen igual de suero de sangre de carnero, que no necesita estar esterilizado (pueden tomarse también 2 de agar por 3 de suero) y se hierve 75-90 minutos, se filtra, se distribuye en tubos y se esteriliza (no debe hervirse más de 60-90 minutos, porque disminuye su valor nutritivo). Colonias grandes fáciles de reconocer, pero los b. resultan de forma análoga a los pseudo b.

El examen de los cultivos puede dar resultado positivo después de las 6 horas de la siembra. Con los tubos se hacen frotos tomando grandes porciones de la superficie y del agua de condensación; con las pla-



cas se hacen preparaciones por compresión. Coloración con el azul de metileno de *Loeffler* (pág. 65). Los b. d. se reconocen por sus formas típicas (forma de cuña o de huso, con porciones alternativamente teñidas y sin teñir). Si no se encuentran b. d. en varias preparaciones, conviene repetir el examen varias veces (hasta 48 horas después de hecha la siembra, especialmente en los casos de reconvalecientes y de portadores de b.). Las colonias del b. d. se reconocen fácilmente, por regla general, desde las 12-16 horas (son hemisféricas blanco amarillentas, húmedas); las colonias sospechosas aparecen más tarde.

Para facilitar el diagnóstico se procede a la coloración de los *corpúsculos polares* según M. Neisser (Hyg. Rdsch. 1903, núm. 14):

1. Teñir 10 segundos con una mezcla de 2 partes de sol. a) con 1 de sol. b). Sol. a): se disuelven 1,0 de azul de metileno (Grübler) en 20,0 de alcohol absol., se añaden 950 de aq. dest. y 50 de a. acético glacial. Sol. b): cristal violeta (Höchst) 1,0, alcohol absol. 10, aq. dest. 300.

2. Lavar con agua y en seguida,

3. Teñir unos 10 segundos con crisoidina (1 parte o mejor 2, disueltas en 300 de aq. hirviendo).

4. Lavar con agua. Entre 2 y 3 puede intercalar se un tratamiento con sol. de iodoiodurada (pág. núm. 2) a la cual se añade 1 % de ácido láctico concentrado. Duración 2-3 segundos. Lavar abundantemente. (*Gins*, D. I. W. 1913, p. 502).

La coloración de corpúsculos polares puede emplearse lo mismo en el examen previo, que para los cultivos de 12-24 horas a 35-36° sobre suero. Los b. d. aparecen con unos corpúsculos azules sobre el protoplasma pardo, en uno de los polos o en los dos, y a veces también en el centro, mientras que los demás bacilos análogos no presentan corpúsculos al ca-



bo de dicho tiempo. El método no es absolutamente seguro, sin embargo, ya que algunas veces (aunque muy pocas) también presentan corpúsculos los pseudobacilos y otras especies, y además los b. d. pueden tardar más tiempo, y en algunos casos excepcionales, dan resultado negativo en la coloración.

Respecto de otros métodos de coloración, v. *Loeffler*, D. m. W. 1907 núm. 5; además C. B. I. Or. 38, p. 359, D. m. W. 1911, p. 2,384, M. n. W. 1912, p. 930.

Cuando existan dudas acerca de si lo encontrado son b. d. o pseudo-b., debe procederse terapéuticamente, como si se hubiese comprobado con certeza que se trata de difteria (por tanto dense inyecciones de suero, en caso de no haberlo hecho ya en seguida, cosa que es siempre preferible), en cambio bacteriológicamente deben seguirse las siembras de los bacilos sospechosos. Si no existen colonias aisladas, recójase material de una región en la que se haya comprobado al microscopio la existencia de bacilos abundantes y distribúyase en un tubo con caldo estéril, haciendo inmediatamente con éste siembras fraccionadas (pág. 37) sobre suero. Aíslense sobre éste tan pronto como sea posible. El diagnóstico diferencial entre los b. d. y los pseudo b., se logra a menudo con más facilidad en la segunda serie de cultivos, por ser mayor el número de colonias y el de bacilos contenidos en éstas. En caso de existir todavía duda se hacen:

a) *Ensayos sobre animales*: Se inyectan subcutáneamente en el pecho de un cobaya de unos 200 gr. una anilla grande de un cultivo puro en suero de 1-2 días a 37°, o bien 0,2-1,0 cc. de un cultivo puro en caldo de la misma edad (v. técnica cap. VIII). Si se trata de b. d. virulentos, el animal enferma a las 24 horas, con abundante infiltración en el punto inyectado y muere por lo general a los 2 días (los órganos



aparecen estériles, congestión renal, secreción de la pleura abundante y serosa, sobre todo, edema grande con frecuencia hemorrágico, en el punto inyectado). Inyectando una dosis igual de b. d. mezclado con una gran cantidad de suero antidiftérico (p. ej. 0,2 cm. en 200 de suero o más) el animal queda vivo y se observa poca o ninguna reacción en el punto inyectado. Inyectando una dosis igual de cultivo de pseudobacilo, producen a lo más un pequeñísimo edema en el punto inyectado (esto ocurre raras veces) pero no matan y, en caso de que produzcan alguna reacción, ésta se presenta también al hacer la inyección junto con suero antidiftérico.

b) Como complemento del diagnóstico diferencial. *Ensayo de la reacción:* se siembran tubos de agua de carne esterilizada, alcalinizada débilmente, preparada con carne fresca (v. pág. 18), poniendo unos 10 cc. en cada tubo. Los b. d. forman ácidos (que a las 24-28 horas corresponden a 0,35-1,0 cc. de SO_4H_2 $\frac{1}{10}$ normal, con fenoltaleína como indicador); el pseudob. de Hofmann-Loeffler forma álcali (equivalente a unos 0,2-0,4 cc. de NaOH $\frac{1}{10}$ n.). Las bacterias del grupo del b. de la xerosis, forman ácidos, algunos en proporción igual al b. d.; por esta razón no resulta decisivo este ensayo (en el caldo resulta difícil la valoración a causa del color propio de aquél).

El cambio de reacción resulta visible empleando los medios de cultivo de *Thiel*: peptona, nutrosa, glucosa, $\overline{\text{aa}}$ 1,0, ClNa y sol. de tornasol Kahlbaum $\overline{\text{aa}}$ 0,5, aq. dest. 100. Después de neutralizar al tornasol añádase 2 cc. de sol. al 1 % de CO_2Na_2 crist. Los b. d. lo enturbian y enrojecen a las 24 horas, los pseudob. lo dejan generalmente claro y azul.

c) Los b. d. se desarrollan anaerobiamente sobre agar con 1,5 % de glucosa y 12,5 de sol. normal de



carbonato sódico, después de llegar a la neutralización, en las zonas altas, mientras que la mayor parte de los pseudob. no se desarrollan.

Toxina diftérica: Contenida en los líquidos de cultivo. Siembras del b. d. en matraces con caldo en capa poco profunda, a 37°. Prepárese el caldo con carne vieja y añádasele un poco de creta pulverizada. Filtrese a las 1-4 semanas (v. pág. 114c) —o bien se matan recubriéndolos de una capa de tolueno—y añádase al filtrado, para conservarlo, 0,5 % de ácido fénico.

Inmunización v. pág. .

El *suero antidiftérico* debe obtenerse de animales muy inmunizados. Se conserva añadiéndole 0,5 % de fenol. La técnica, para determinar su valor, puede verse en *Ehrlich*, *Klin. Jahrb* t. VI.

8. Bacilo de la influenza

Los cultivos se desarrollan sólo a temperaturas superiores a 30°, sobre agar recubierto de sangre (preferible la sangre de paloma, que puede obtenerse estéril con facilidad sangrando una vena de la cara interna del ala) o mejor mezclado con aquélla (en proporción necesaria para que el agar quede casi rojizo). Se emplea también, como medio de cultivo, el caldo adicionado de $\frac{1}{3}$ -1 % de sangre (se hace congelar y se descongela de nuevo, con lo cual queda disuelta la hemoglobina). Conviene ensayar la esterilidad de los medios adicionados de sangre, teniéndolos 24 horas a 37°, antes de sembrarlos.—Inmóvil, bacilos muy pequeños. Se inoculan únicamente los monos.

Para el *aislamiento* del b. influenza, se toma como materia de ensayo un esputo bronquial (desprovisto previamente de la parte mucosa, por una serie



de lavados en agua estéril, contenida en varios pocillos) o, en caso de muerte ocasionada por influenza-pneumonía, se añade un poco de la secreción de los focos bronco-pneumónicos en 1-2 cc. de caldo, agitándolo hasta obtener emulsión ligeramente turbia.

Con esta disgregación se consigue: primero, que los b. influenza queden de tal modo diseminados, que se puedan obtener colonias aisladas del mismo; segundo, el diluir de tal modo la hemoglobina contenida en el material examinado, que el desarrollo se imposibilita del todo en el medio no adicionado de sangre. Se siembra con dicha emulsión sobre agar ordinario, o agar glicerinado y sobre agar-sangre. A las 24 horas de estar en la estufa, se ven sobre los medios con sangre, unas pequeñísimas colonias parecidas a gotas de rocío debidas al b. influenza. En los otros medios no se desarrollan. Si van acompañadas dichas colonias de otras de *Stafilococcus aureus*, pueden ser muy grandes. —El b. de la influenza es muy parecido morfológica y biológicamente, a los bacilos que se encuentran en los esputos de tos ferina y en los de determinados catarrros de la conjuntiva. (Bac. de Koch-Week).

Para colorar, azul metileno de Loeffler, mejor aún sol. de fuchina fenicada diluída al décimo (v. pág. 65, teñir durante varios minutos!) No puede emplearse el método de Gram. Los cortes se tiñen según el método de Pfeiffer (v. pág. 67).

N. B. No todas las enfermedades llamadas hoy influenza lo son verdaderamente.

9. Bacilos tíficos

(incluso los paratíficos) (v. la tabla final).

Los b. tif. pueden germinar sobre toda clase de



medios de cultivo. Se desarrollan también a la temperatura ordinaria y sobre medios ligeramente ácidos.

Se tiñen con todos los colores ordinarios de anilina, no toman el Gram; las preparaciones de cultivos deben fijarse bien sobre el cubre, pues se desprenden con facilidad los bacilos. Al examinar cortes (debe diferenciarse con cuidado porque los b. tif. se decoloran fácilmente) del bazo humano; búsquense al principio y con poco aumento los haces de bacilos que aparecen como manchas de color azul celeste, al teñir con azul de metileno, rojo brillantes con la fuchina—fenicada o anilinada, o violetas, teñidas con tinina. Para obtener haces grandes, déjese el bazo envuelto en un paño humedecido en sol. de sublimado para impedir la putrefacción superficial, en la estufa a 37°, durante 6-12 horas; de este modo se multiplican abundantemente los b. tif. (Luego se endurece).—No se forman esporas.

Diagnóstico diferencial entre el b. tif. y sus análogos (bact. coli, b. paratíf., b. de la disentería etc.) (v. la tabla, pág.).

1. Los b. tif. tienen movimientos vivos (parecidos a los de las hormigas) y están dotados de numerosos cirros peritricos, largos, que se desprenden con facilidad.

2. Sobre placas de gelatina los b. tif. forman *colonias profundas*, grises o amarillas, redondas, ovaladas o en forma de piedra de afilar y colonias *superficiales* grises muy finas, en forma de velo, con embudo profundo. Al cabo de algunos días las colonias toman color pardo. No licuan.

3. Sobre las patatas, forman los b. tif. un musgo apenas visible. Deben hacerse siembras comparativas sobre fragmentos de la misma patata o en distintos



sitios de la misma (con los b. tif. y los parecidos a él).

4. Los b. tif. se desarrollan sobre la leche pero no la coagulan (incubación a 37° durante varios días).

5. En el suero de leche tornasolado, los b. tif. producen a lo más 3 % de ácido $\frac{1}{10}$ n. (el suero se conserva claro generalmente y se vuelve sólo violeta sensible.)

6. Los b. tif. no hacen fermentar la glucosa. (Ensayo v. pág. 46; resulta ventajosa la distribución o la picadura en tubos de agar glucosado o bien la siembra en caldo azucarado en tubos de fermentación. Optimo a 37°).

7. Los b. tif. no forman indol. (ensayo, v. página 49).

8. Los b. tif. no alteran el color del agar-rojo neutro (agar con 0,75 % de éste, 0,3 % de glucosa al que se añade 1 % de sol saturada en frío de rojo neutro y esterilizado al vapor. Siembras en picadura, en tubos muy llenos o bien distribuyendo en el medio de cultivo licuado).

9. Los b. tif. no alteran una sol. dil. de tornasol, con 1 % de nutrosa, 0,5 % de ClNa y 1 % de lactosa (Medio de cultivo de *Barsiekow*, preparado de modo análogo al agar-nutrosa tornasolado, pág. 115; fíltrese la sol. de nutrosa - ClNa hasta que esté clara) a 37°, al cabo de 24 horas.

10. La misma solución con 1 % de glucosa en lugar de la lactosa se tiñe en rojo y se coagula a las 24 horas por la acción del b. tif.

Pueden prepararse sol. de «verde malaquita» con reacciones análogas (v. *Loeffler*, D. m. W. 1909, núm. 30); medios con orsellina, (v. *Buchholz*, Zeit. f. Hyg. t. 56, pág. 220).

Las propiedades indicadas o algunas de ellas, pueden utilizarse para establecer un límite respecto de las bacterias análogas del grupo llamado del tífus-co-



li. Entre ellos deben tomarse en consideración, el bact. coli (v. pág. 122) y los paratíficos. Estos últimos se denominan A y B y producen enfermedades análogas clínicamente al tifus; el b. ptif. B produce además catarros gastrointestinales agudos (v. además Intoxicación cárnea pág. 122). Se le parecen mucho también el *bac. faecalis alcalígenes* (contenido a veces en los intestinos) y el b. de la *disentería*. En la tabla comparativa del final de esta obra, se indican las diferencias principales. Para conseguir una diferenciación rápida se utilizan generalmente los medios de cultivo siguientes, en tubos, formando la llamada *serie del coli*: agar, caldo (movilidad), agua de peptona (formación de indol), suero tornasol, leche, sol. de tornasol-nutrosa-lactosa, la misma con glucosa, agar con rojo neutro (diferenciación de las especies de la disentería; v. además pág. 124). No obstante las diferencias en los cultivos y las biológicas no ofrecen absoluta constancia, ni aun en las razas antiguas. La diferenciación más segura la dan las suerorreacciones, que resultan completamente específicas, es decir, que cada especie del grupo reacciona únicamente con el suero preparado específicamente para ella o a lo más reacciona con sueros concentrados de otras especies, pero débilmente).

Las **suerorreacciones** se efectúan en forma de *bacteriolisis en el cuerpo animal (a)* o en forma de *aglutinación (b)*.

a) **Bacteriolisis en el cuerpo animal** (reacción llamada de *Pfeiffer*).

Fundamento: Los b. tíf. inyectados en el peritoneo de un cobaya, junto con suero de un animal fuertemente inmunizado, se «disuelven» *rápidamente* (se disgregan visiblemente) no ocurriéndoles nada si la inyección se hace con suero de un animal normal. Los b. parecidos al tífico no reaccionan con ninguno



de los sueros (sólo tienen valor para proporciones determinadas de suero y de cultivo y para una virulencia conocida de los bacilos).

Ejecución. Se necesitan:

α) conocimiento exacto de la *eficacia* del suero inmunizante (su título). Se determina éste mediante cultivos virulentos de b. tíf., diluyendo $\frac{1}{10}$ de öse, equivalente a 0,2 mgr. (v. modo de dosificar capítulo VII) en 1 cc. de caldo. Inyectado intraperitonealmente en un cobaya de unos 250 gr., le produce la muerte a las 24 horas, con rápido descenso de temperatura y multiplicación abundante de los bacilos. Se diluye suero en caldo de cultivo, de modo que la concentración corresponda a 0,01, 0,005, 0,001 y aun menos de suero, se deslíe en cada una de las diluciones una öse del cultivo virulento sobre agar, germinado unas 20 horas (es decir 10 veces la dosis mortal) y de cada mezcla se inyecta un cc. en el peritoneo de un cobaya diferente (v. la técnica cap. VIII). Se hacen tomas del contenido del peritoneo en intervalos de tiempo diferentes (a los 30, 60, 90, 120 minutos) (v. la técnica pág. 3) y se examina en gota suspendida. Si al cabo de 2 horas a lo más, los b. han desaparecido o empiezan a disolverse o quedan sólo algunos, aislados, inmóviles, queda comprobado que la dosis de suero inmuniza todavía el animal. Este queda con vida, sin haber experimentado gran descenso de temperatura. La dosis mínima, que posee todavía esta eficacia, es el *título* del suero. El que se utilice en las reacciones debe tener un título de 0,001 o menor aún (p. ej. 0,0001). (Modo de obtener el suero v. capítulo VIII, final).

β) Suero de un animal normal de la misma especie que el que proporcionó el suero inmunizante. (Inmuniza sólo a dosis mucho mayores que el suero inmunizante, p. ej. de $\frac{1}{10}$ de cc. o más).



γ) Un cultivo sobre agar germinado a 37°, durante 20 horas, de la especie que se examina.

δ) Dos cobayas de unos 250 gr. de peso. El cobaya A recibe una inyección de: una öse de cultivo sobre agar=2 mgr., de la especie bacteriana examinada, diluída en 1 cc. de caldo que contiene una dosis de suero igual a 10 veces su título (u otra dosis mayor, pero sin exceder jamás de 0,02 cc., ya que entonces podría entrar en consideración la influencia del suero normal). El cobaya B recibe la misma dosis de cultivo desleída en una mezcla de 0,95 cc. de caldo con 0,05 cc. de suero normal.

El contenido peritoneal de ambos se examina a los 30, 60, 120 minutos. (Tomas hechas con capilares); observación ulterior de los animales.

Puede ocurrir:

1°. Que en el cobaya A, desaparezcan rápidamente los b., sobreviviendo el animal. En el B no desaparecen los b.; multiplicándose por el contrario, y el animal muere con descenso de temperatura. *Consecuencia:* El cultivo examinado era de verdadero b. tí. puesto que el suero inmunizante ha actuado, mientras que el suero normal no.

2°. (Ocurre raras veces con las razas recientemente germinadas). Desaparecen los b. en los cobayas A y B, sobreviviendo ambos. *Consecuencia:* El cultivo es poco virulento para realizar los ensayos (N. B. No debe aumentarse la dosis de cultivo a más de 1 öse). En caso necesario se aumenta la virulencia mediante pasos por el cobaya; p. ej. 1. Inyectando intraperitonealmente 2 anillas muere el animal. Se prepara un cultivo sobre agar con el contenido intraperitoneal; 2. Se inyecta 1 öse de este cultivo en el peritoneo y muere el cobaya. Se prepara como antes un cultivo sobre agar y se inyecta $\frac{3}{4}$ el öse, produciendo la muerte del animal; 3. Con el último cultivo se hace



la reacción tomando 1 öse + suero, como se indicó antes.

3.º Los b. no desaparecen en ninguno de los dos cobayas. Ambos mueren. *Consecuencia:* El cultivo examinado no es de b. tíf. (No se conocen b. tíf. de una virulencia tal, que maten el animal aun en presencia de 10 veces la dosis de suero inmunizante).

b) **Aglutinación** (de *Gruber-Durham*). *Fundamento:* El suero antitífico aun a dosis muy pequeñas, inmoviliza los b. tíf. reuniéndolos en hacecillos (el suero normal lo efectúa sólo a concentración mucho mayor; sobre los b. parecidos al tíf. el suero inmunizante actúa con poca diferencia del normal).

Ejecución. Se necesitan:

a) Suero inmunizante de eficacia conocida. Para comprobarla se hacen del modo indicado en la página 109 a), diluciones de cultivos virulentos de b. tíf. en sol. a 0,85 % de ClNa, completamente clara, adicionada de proporciones diferentes de suero inmunizante (v. la técnica pág. 119), dentro de tubos pequeños (de 0,5-0,8 cm. de diámetro, 6-8 de largo y con el fondo cónico) y se observa primero, en gota suspendida, con pequeño aumento, en cual de las gotas mantenidas a 37º, se presenta primero el hacinamiento de los b. antes de 2 horas. La cantidad mínima necesaria para producir este efecto, es el título del suero para el ensayo de las gotas; y *segundo*, a qué concentración de suero se presenta en los tubos la formación de copos visibles a simple vista o con una lente o bien mediante el aglutinoscopio de *Woithe*, al cabo de dos horas a lo más; la cantidad mínima que produce dicho efecto constituye el título para el ensayo en los tubos. Para éste último la actividad del suero debe ponerse de manifiesto a una dilución del 1 : 1000 por lo menos.



β) Un cultivo sobre agar germinado unas 20 horas a 37°, de la especie que quiera examinarse.

Se preparan distintas diluciones de suero inmuni-
zante en ClNa al 0,85 %, en los tubos indicados
en α), p. ej. al 1 : 100, 1 : 300, 1 : 500, 1 : 1000 (v. la
técnica pág. 118), colocando un cc. en cada uno, se
rotulan exactamente y se añade a cada uno una anilla
pequeña (2 mgr.) del cultivo que se examina, des-
liéndolo bien en el líquido, teniendo inclinado el
tubo. No debe tomarse una concentración superior al
1 : 100, para evitar que influya la acción coagulante
del suero normal.

Como testigo, se toma un tubo con solución de
ClNa (1 cc.) al que se añade la misma cantidad de
material bacteriano que a los demás tubos, pero sin
añadir suero (para comprobar si se presenta coagula-
ción espontánea). Puede prepararse además una gota
suspendida con el líquido de cada tubo y conservarla
en la estufa a 37°, junto a aquéllos. La observación
se hace hasta las dos horas, como en α (las gotas
suspendidas se observan con poco aumento).

Discusión de los resultados:

1.º Si los b. se hacían en todos los tubos con
suero, por lo menos hasta los que lo contienen en
proporción de medio título, y en cambio, el tubo con
cloruro sódico solo, no da aglutinación, se trata se-
guramente de un cultivo de b. tíf.

2.º Si los b. sólo se hacían en los tubos que
contienen las concentraciones mayores de suero,
puede tratarse de un b. parecido al tífico o bien de
una variedad de b. tíf. difícilmente aglutinable. Si las
restantes observaciones corresponden al b. tíf., de-
ben repetirse los ensayos después de resembrar algu-
nas veces.

3.º Si los b. no se aglutinan en ninguno de los tu-



bos, debe admitirse, en general, que no se trata de b. tíf. Ocurre, no obstante, que los b. tíf. sembrados directamente del hombre, no resultan aglutinables hasta después de resembrarlos algunas veces; por tanto conviene repetir el ensayo como en 2.

4.º Si los b. se aglutinan también en el tubo testigo con cloruro sódico, el cultivo que se examina no resulta apropiado para el ensayo de la aglutinación (cosa que casi nunca ocurre con b. tíf. sembrados de material humano).

Para ahorrarse tiempo y suero inmunizante, puede hacerse un *ensayo previo*, antes de la determinación cuantitativa descrita; se coloca sobre un portaobjetos una gota grande de dilución de suero en CINA (0,85 %) al 1 : 10 y al lado se pone una gota de CINA sólo. A cada una de ellas se le añade una punta de alfiler del cultivo ensayado (primero a la gota de cloruro sólo) y se da un movimiento de vaivén al porta observando si en la gota de suero, se produce en seguida aglutinación. Si no la hay, puede deducirse en general, que no existen b. tíf.

Los ensayos de aglutinación pueden también hacerse en pocillos de vidrio con tapadera. La observación debe hacerse con una lente y sobre fondo negro.

Para la obtención del suero inmunizante v. pág.

. *El suero de los convalecientes de tifus, no resulta apropiado para el diagnóstico diferencial de los cultivos, porque es demasiado débil y además aglutina en muchos casos, los b. análogos al tífico (v. pág. 120, c).*

Diagnóstico bacteriológico de una infección tífica en el hombre

El método más seguro consiste en comprobar la presencia del b. tíf. en los tejidos o en las deyeccio-



nes; la acción aglutinante del suero no aparece hasta que la enfermedad está en curso, a veces hasta el final, o no aparece. A ser posible resulta preferible hacer el ensayo 2 (v. más abajo), aunque también son buenos los núms. 1, 3 y 5; el 4 queda en último término; en una misma toma de sangre pueden hacerse los ensayos 2 y 5 (v. 2, al final). Los gérmenes obtenidos por siembra directa del cuerpo humano, deben examinarse bajo diferentes criterios (v. pág. 107, n.º 4) en especial por el ensayo del suero, puesto que pueden presentarse infecciones de carácter tífico, originadas, no por el b. tíf., sino por otros microbios análogos.

1. *Análisis de las roseolas.* Límpiase la epidermis frotando suavemente con algodón, alcohol y éter. Hágase con el bisturí una pequeña incisión en la roseola y tómase *en seguida*, antes de que salga sangre, un poco del líquido con la punta del bisturí, y siémbrese en caldo. Póngase sobre la herida un par de gotas de caldo para evitar que se forme un coágulo grande y siémbrese en caldo, la sangre diluída de este modo. Deben examinarse siempre varias roseolas y sólo las *recientes*. El método da resultado positivo en el 75 % de los casos.

2. *Investigación del b. tíf. en la sangre.* Tómense por medio de una cánula (v. cap. VII) 10-20 cc. de sangre de la vena mediana. Se hacen las siembras en placas mezclándola con agar a unos 45° (3 : 1 de sangre). Las colonias de los b. tíf. y para tíf. aparecen verde-negruczas. Da resultado seguro en el 90 % de los casos, desde la primera semana de la enfermedad. Puede conseguirse la multiplicación de b. añadiendo sangre (unos 2,5 cc. : 5 cc.) a *bilis de buey* esterilizada (también añadiendo 10 % de peptona y de glicerina); los coágulos deben desmenuzarse bien, dejándolos 12-24 horas a 37°. Luego se siembra en placas



(v. capítulo 3); en caso de resultado negativo, repítase el ensayo a las 48 y a las 72 horas. La mezcla con bilis, en la que la sangre queda sin coagular, resulta recomendable para el envío del material a examinar. (Pueden adquirirse tubos con bilis preparada según *Conradi-Kayser* de la casa *E. Merck-Darmstadt* y de *F. y M. Lautenschläger-Berlín*). También puede utilizarse para la investigación del b. tif., el coágulo de sangre resultante de la toma hecha para el ensayo *Widal*; debe hacerse previamente la acumulación de b. desmenuzándola en tubos de bilis (disolución por tripsina, v. *Kirstein*, C. B. I. Or. 59, p. 478).

3. *Investigación del b. tif. en las heces.*

Los bacilos son abundantes al terminar la primera semana de la enfermedad, haciéndose escasos en la 4 y 5 semana y abundando de nuevo durante la convalecencia. Para los cultivos pueden utilizarse los medios siguientes:

a) *Agar (nutrosa) tornasol*, según v. *Drigalski* y *Conradi* (Zeit. f. Hyg. t. 39): Se licua a unos 50° 1 litro de agar preparado con agua de carne a la que se añade 3,5 % de agar, 1 % de peptona, 0,5 % de sal (en caso de que el extracto de carne no la contenga) y 1 % de nutrosa (si se cree necesario) alcalinizándolo ligeramente respecto del tornasol. El agar líquido y caliente se mezcla con la solución siguiente, también caliente: sol. de tornasol según *Kubel-Tiemann* (preparada por *O. Kahlbaum* de Berlín-Adlershof) 130 cc., hervidos durante 10 minutos + 15 gr. de lactosa pura, hirviendo de nuevo 15 minutos, no más. A la mezcla de agar-lactosa-tornasol, bien agitada, se le añade en seguida y gota a gota, sol. al 10 % de carbonato sódico anhidro, hasta que la espuma roja producida al agitar se vuelva azul-violeta; luego se le añaden 10 cc. de una solución reciente de 0,1 gr. de cristal-violeta (de la casa *Höchst*) B, 100 de



agua dest. estéril y caliente. La mezcla final se distribuye para su uso inmediato, en cápsulas Petri, o en cápsulas dobles mayores (de 20 cm. de diámetro, en capa de 2 mm., o bien se guarda en matraces de 200 cc. (no deben usarse mayores, porque resulta necesario calentarlos demasiado para fundirlos). La siembra, superficial, fraccionada, extendiendo el material con una espátula de vidrio. Las deyecciones muy claras se siembran, directamente y después de diluir en 10-20 veces su volumen de sol. de ClNa al 0,85 %, distribuyéndolos sucesivamente en varias placas; de las heces sólidas se deslíe un poco en la misma solución de ClNa. Las placas sembradas deben dejarse por lo menos $\frac{1}{2}$ hora, destapadas y protegidas del polvo, cerrándolas luego y dejándolas a 37°. El examen se hace a las 14-24 horas. Las colonias de b. tíf. son de 1-3 mm., azules vítreas, sin doble contorno, parecidas a gotas de rocío, las de b. paratíf. son iguales; las de b. coli, son de 2-6 mm., de color rojo brillante y opacas. Las colonias de aspecto tíf. se siembran sobre agar inclinado.

b) Medios de cultivo con fuchina según Endo (C. G. I. Or. 35, pág. 109): 1 litro de agar al 3 % (v. página 17) se neutraliza y alcaliniza con 10 cc. de CO_3Na^+ al 10 %, añadiendo luego 10 gr. de lactosa pura disueltos en un poco de aq. dest. hirviendo y 5 cc. de una sol. alc. sat. de fuchina, recién filtrada; finalmente se añade sol. reciente de sulfito sódico al 10 % (unos 25 cc.) hasta que el agar tenga un tinte rosa en caliente y en frío sea casi incoloro (en caso necesario háganse placas de prueba). Después de esterilizar, consérvase en la obscuridad a ser posible fuera del contacto del aire, en porciones pequeñas (frasquitos o tubos con cierre patentado). Siembras en cápsulas como en *a*). Los b. tíf. y paratíf. incoloros; los b. coli teñidos en rojo intenso. (No debe sembrarse antes de las 20-22



horas).—Pueden adquirirse tabletas Endo, que se añaden al agar ordinario, de la casa E. Merck-Darmstadt.)

c) *Medios de cultivo con rojo Congo*, según Liebermann y Acel (D. m. W. 1914, pág. 2093): A 1 litro de agar alcalinizado ligeramente con sol. de carbonato sódico, se le añaden 15 gr. de lactosa y 3. gr. de rojo Congo. Se hierve, se mezcla bien y se guarda estéril, en pequeñas porciones. Los b. tíf. tiñen en rojo transparente; los b. coli tiñen en azul-negruzco.

d) *Agar con verde malaquita-safranina-reinblau* según Loeffler (D. m. W. 1909, núm 30): Se toma 1 litro de agar neutro al 3 % y se le añaden 5 cc. de sosa normal y 100 cc. de sol. al 10 % de nutrosa, por litro, distribuyéndolo en frascos de vidrio Jena, dejándolo hasta que se aclare. A cada 100 cc. del agar clarificado y frío a unos 45°, se les añaden: 3 cc. bilis de buey esterilizada, 1 cc. de sol. al 0,2 % de «safranina pura» de Grübler, 3 cc. de sol. acuosa de «Reinblau» doble conc. de la fábrica Höchst, y 3-4 cc. de sol. acuosa al 0,2 % de «verde malaquita quím. puro crist.» de la casa Höchst. Se mezcla bien el todo y se distribuye en placas, sembrando como en a). Los b. tíf. dan colonias azules aplanadas, piramidales con la superficie rugosa, y con brillo metálico; después de las 24 horas las de paratíf. A, son análogas, las del B, circulares, translúcidas, azuladas, las de b. Gärtner, redondas, húmedas, rojas, las de b. coli, rojas o rojizas.

Agar-verde malaquita para la acumulación de los b. tíf. y paratíf. (v. Lentz y Tietz. Klin. Jahrb. 1905, pág. 495): Se mezclan primero porciones de 20 cc. de agar con cantidades diferentes de sol. al 0,5 % de verde malaquita y con las mezclas se preparan placas que se siembran por mitad con b. tíf. y bact. coli. El colorante retarda el desarrollo del coli y no el del b. tíf. (hasta el 1:6000, generalmente). Prepárese reserva de



agar. Al hacer análisis conviene sembrar las placas abundantemente con la deyección; a las 24 horas de estar en la estufa se moja la superficie con 5 cc. de sol. a 0,85 % de ClNa (sin frotar) y después de dejarlo 5 minutos en reposo se siembran dos o tres anillas sobre placas con los medios de cultivo a-c.

e) *Medios de cultivo tricolares* según Gassner, v. C. B. I. Or. 8o, pág. 219.

Otros métodos para la acumulación de b. tíf. en las deyecciones:

a) *Mediante bolo blanco* (Kuhn, M. Kl. 1916 número 36): Se deslíen las heces en sol. de ClNa, se filtra por una torunda de algodón, sobre una placa perforada de porcelana y a 4-5 cc. del filtrado se le añaden 0,02 gr. de bolo b. y se agita. Al cabo de algunos minutos se decanta el líquido claro y el sedimento desleído en sol. de ClNa se siembra en placas.

b). *Método del éter de petróleo*, v. Bierast B. kl. W. 1916, núm 20.

4. **Investigación del b. tíf. en la orina.** Puede hacerse por centrifugación y siembra del sedimento sobre los medios pág. 115 y sigs., a-d, o por acumulación mediante bolo b. (v. más arriba); o se trata la orina como el agua (v. pág. 121)—Los b. tíf. se encuentran en la orina después de la tercera semana de la infección. Generalmente, persisten en ella poco tiempo.

5. **Suerorreacción de Widal.** *Principio.* El suero de los tíficos posee poder aglutinante para el b. tíf., generalmente a los 8 días de iniciada la afección (véase pág. 111). El suero del hombre sano no aglutina en cambio hasta una concentración mucho mayor (1:50). (N. B. Las distintas variedades de b. tíf. son aglutinadas con intensidad diferente, debiendo buscarse mediante un ensayo con suero inmunizante cual es la conveniente).

Ejecución (v. también las instrucciones dictadas



para los laboratorios montados para combatir el tífus. Arb. K. G. A., t. 41, pág. 18).

El suero obtenido según cap. VII, 1, exento de glóbulos rojos en cuanto sea posible (centrifugado) se mide con una pipeta de 1 cc., dividida en $\frac{1}{100}$ y se mezcla con nueve veces su volumen de sol. al 0,85 % de ClNa, dentro de pequeños tubos de ensayo. De esta dilución al 1:10 se toman 0,2 cc. y se les añade 0,8 de sol. de ClNa, en otro tubo (dilución 1:50.) Otros 0,2 cc. se diluyen en 1,8 cc. de ClNa (dilución 1:100). De esta última se toma 1 cc. y se distribuye en la forma siguiente, en tres tubos de ensayo: 1.º, 0,34 cc. + 0,66 cc. de ClNa (dil. 1:300); 2.º, 0,2 + 0,8 (dil. 1:500); 3.º, 0,1 + 0,9 (dil. 1:1000). Si se desean diluciones mayores, se preparan de modo análogo. Si sólo se dispone de poco suero se reemplaza una parte de la sol. de ClNa por suspensión espesa y homogénea del ensayado (v. más abajo) en sol de ClNa.

La aglutinación puede hacerse.

a) *Microscópicamente*. Se colocan sobre un cubreobjetos, gotitas de las diluciones 1:50 y 1:100 y se añade a cada una, una punta de alfiler de un cultivo de b. tíf. sobre agar de menos de 24 horas (se deslíe bien de modo que queden las gotas homogéneamente turbias); en otras gotas se hace lo mismo con cultivo de b. paratíf. B (si el ensayo da resultado negativo, se hacen también con el A). Luego se examinan las gotas *suspendidas*, con débil aumento.

b) *Macroscópicamente*: Se toman tubitos conteniendo cada uno 1 cc. de la dilución de suero y se les añade una òse normal (2 mgr., v. cap. VIII) de cultivo tífico (v. a) a cada uno y se mezcla bien frotándolo cuidadosamente con el líquido contra la pared. A otros tubitos se les añade cultivo de b. paratíf. B (si el ensayo resulta negativo, se hace lo mismo con el b. paratíf. A). El examen se hace como en la pág. 112.



En los ensayos *a*) y *b*) se dejan 2 horas a 37° o 12 horas a la temperatura ambiente.

Discusión de los resultados: La gota de la dilución 1 : 50, sirve sólo de orientación. En cambio la dil. 1 : 100, se considerará positiva cuando aparezcan en todo el campo de visión, hacecillos abundantes, donde al principio sólo existían b. aisladas. Si el *ensayo en tubo* al 1 : 100 resulta positivo, queda confirmada la infección tífica. Resultado positivo en el ensayo al 1 : 50, hace el caso sólo sospechoso y conviene repetirlo con una nueva toma de sangre. La aglutinación de los b. paratíf. despierta la sospecha de infección paratífica; para confirmarla es indispensable hacer cultivos directos del b. Conviene determinar los límites de eficacia del suero respecto de los b. tíf. y paratífico.

La suerorreacción de Widal está afectada por *numerosas causas de error*, en particular las siguientes:

a) El suero de un hombre que haya sufrido el tifus, meses o años antes, y que sufra luego otra afección distinta, puede aglutinar el b. tíf. Lo mismo puede ocurrir con los vacunados contra el tifus. El suero de los ictéricos, puede tener un poder aglutinante pronunciado.

b) El poder aglutinante del suero, no aparece en los tíficos (aun en los ligeramente enfermos) en un momento determinado de la infección y aun puede no aparecer. En caso de resultado negativo para la aglutinación, si la sospecha clínica de tifus persiste, conviene repetir el ensayo en intervalos de algunos días.

c) En caso de infección tífica, el suero puede tener poder aglutinante sobre los b. paratíf. y viceversa, el suero de un paratífico puede aglutinar los b. tíf. No obstante, el b. causante de la infección, resulta aglutinado, por regla general, cuatro veces más que el otro, sobre el cual actúa sólo en virtud de una



llamada «reacción de grupo». (Parentesco de familia de las diversas especies bacterianas) entre ciertos límites. (La elección del cultivo más conveniente para éste ensayo se hace según pág. 118 al final).

A pesar de lo indicado, la reacción Widal conserva gran valor, cuando se hace una justa crítica de los resultados, contribuyendo al diagnóstico clínico. Desde los puntos de vista terapéutico y sanitario, las infecciones tíficas y las paratíficas deben tratarse de modo idéntico.

Al dar el resultado, no basta decir que «la reacción Widal es positiva»; hace falta indicar la clase de ensayo hecho (gota o tubo), la *eficacia* del suero, el *tiempo* en qué se verificó la aglutinación y la *intensidad* de la reacción. (Aglutinación total, etc.)

Pueden adquirirse preparaciones de b. tíf. y paratífico para la reacción *Widal*, exentas de gérmenes vivos, de la casa E. Merck-Darmstadt. (*Diagnóstico de Ficker para el tifus*, B. Kl. 1903 núm 45); utilizable en las reacciones en tubos, de manejo práctico y cómodo. O bien, se deja un cultivo en caldo, de 24 horas, adicionado de 1 % de formalina (sol. a 40 %) durante 2 días a 37°, se separa el líquido del sedimento y se guarda en la nevera. Es estable, se aglutina lentamente, pero con más facilidad cada vez.

Aislamiento del b. tífico en el agua

Resulta difícil. Ensáyese filtrando una cantidad considerable de agua, por el procedimiento de *Hesse* (cap. IX) o evaporando muchas porciones de 5-10 cc. de agua sobre placas (v. cap. IX) o por precipitación según *Müller* (*Zeit. f. Hyg.* 51, pág 1): se añaden 5 cc. de oxiclورو férrico oficial (hidrato féñico coloide) por cada 3 litros de agua y se deja en reposo varias



horas decantado luego. En todos los casos debe sembrarse sobre placas (pág. 115, a-d.)

10. Bacilo (*bacterium*) coli (v. la tabla final)

Los representantes típicos de *este grupo bacteriano* son algo móviles; llevan 4-12 cirros laterales, forman sobre la gelatina películas superficiales fuertes y colonias redondas profundas, de color pardo, sin licuar; sobre las patatas producen extensas colonias de color gris-amarillento; hacen fermentar la glucosa, lactosa, manito y maltosa, y en parte, también la sacarosa, y enrojecen los medios de cultivo tornasolados (v. los b. del tifus y de la disentería), producen indol, en el suero de leche-tornasol, producen continuamente ácidos en gran cantidad. Existen variedades que carecen de una o varias de estas propiedades; pero ninguna de ellas licua la gelatina. Diferenciación del b. tífico, v. pág. 106 y sigs.; del b. de la disenteria, v. pág. 124. No toma el Gram. Patógeno para los cobayas, en inyección intraperitoneal (peritonitis, septicemia) y a veces también en inyección subcutánea para los cobayas y las ratas. (supuración, septicemia.) La aglutinación por un suero específico como en la pág. 111, no obstante el suero inmunizante no actúa del mismo modo sobre todas las variedades sino únicamente en las inmunizables y a veces en alguna otra.

Ensayo de *Eijkman*, v. cap. IX, final.

11. Bacterias de la intoxicación por la carne (v. la tabla final).

Las intoxicaciones por la carne en forma de catarrros intestinales agudos, se deben a la ingestión de



carne de animales enfermos o de carne sana infectada post mortem. Los gérmenes que las producen son generalmente *b. paratíf. B*, formando un grupo aparte, caracterizado tan sólo por las suerorreacciones (reacción únicamente por el suero específico correspondiente) dentro de los mencionados, el *b. enteritidis Gärtner*. Resultan sospechosas las reses vacunas con catarro intestinal, inflamaciones purulentas e infección uterina puerperal, así como en las terneras, la supuración del ombligo.

En tales casos, así como en la infección séptica, se recomienda el,

Examen microscópico de la carne (v. V. K. G. A. 1914, pág. 681). Se disponen para el examen cubos de carne cortados de los músculos, de 6-8 cm. de lado, el bazo, el riñón y huesos cortos huecos. Se remiten a gran velocidad, embalados en serrín. Para el análisis se flamea la superficie, se cortan con instrumentos estériles y se mezcla el raspado del centro, con agar fundido, distribuyéndolo en placas según pág. 115 a, b, d. También puede hacerse la acumulación con fragmentos de músculo mantenidos 6-12 horas en caldo a 37° y luego se hace la siembra como antes. Si se desarrollan *b. paratíf. B* o *b. enterit. Gärtner*, u otras productoras de enfermedades infecciosas, debe inutilizarse el animal muerto; la existencia en los músculos de otras bacterias, en gran número, inutiliza también la carne. Si las bacterias son muy pocas y no patógenas puede comerse la carne.

Intoxicaciones producidas por los embutidos y la carne en salmuera (botulismo) puede ser debida a una contaminación post mortem, por el *b. botulinus*. Son bacilos delgados con 4-8 cirros peritricos, movibles, anaerobios obligados, con esporas terminales sencillas. El Gram resulta inseguro. Desarrollo óptimo sobre medios glucosados, a 25-30°. Licua la gelatina con



desprendimiento de gases. Inyección subcutánea de cultivo en caldo, en muy pequeña cantidad, produce rápidamente paresia motriz, midriasis y a veces la muerte. No se multiplican en el cuerpo animal.

12. Bacilos de la disentería

(v. la tabla final)

Morfológica y biológicamente se parece mucho al b. tíf., distinguiéndose de él en que es inmóvil (presenta solamente movimiento mocular muy acentuado) por ciertos detalles en los cultivos y por las suero-reacciones.

Germina sobre heces fecales recién expulsadas (los copos mucosos se lavan en sol. de ClNa al 0,85 %, esterilizada), sobre agar-nutrosa, preparado según página 115 a, pero sin añadirle cristal violeta (la nutrosa es indispensable). Colonias azules como las del b. tífico. Puede emplearse también el agar según *Endo*, (pág. 116 b); colonias incoloras como el b. tíf. Debe ensayarse la acumulación con bolo blanco (pág. 118) —En los casos antiguos puede hacerse el raspado del intestino enfermo mediante el rectoscopio.

Se conocen diferentes tipos; uno muy tóxico (b. de *Kruse-Shiga*) y otros poco tóxicos (especialmente los b. de *Flexner* y el b. Y) designándose estos últimos también b. de la pseudodisentería.

Tipo A (de Kruse-Shiga)

1. No forma indol (ensayo según pág. 49).
2. No coagula la leche.
3. No hace fermentar la glucosa (ensayo según la pág. 107 núm. 6; en la prueba pág. 107 núm. 10, pro-



duce sólo enrojecimiento y a veces lo enturbia después).

4. No produce fermentación ni cambio de color en el agar glucosado, con rojo neutro (pág. 107 núm. 5).

5. Se desarrolla sobre el suero de leche con tornasol, como el b. tíf. (pág. 107 núm. 5).

6. No produce enrojecimiento en las placas de agar manita-tornasol y de agar maltosa-tornasol (preparadas según la pág. 115 a, pero reemplazando la lactosa por los otros azúcares), en cultivo por picadura produce, a lo sumo, decoloración en la parte profunda (los b. tíf. los enrojecen, los b. paratíf. y el coli, enrojecen y fermentan respecto a los demás tipos de b. de la disentería; v. más abajo).

7. Los cultivos filtrados o no, son muy tóxicos, a dosis muy pequeñas, para ratas y ratones.

8. La aglutinación se produce hasta los límites señalados por el título de suero de animales inmunizados con b. disentérico del mismo tipo. No se aglutinan con suero preparado con b. de otros tipos. La inmunización es difícil a causa de su gran toxicidad.

El suero de los enfermos de disentería producido por el tipo A, aglutina (a veces ya desde el 5° día de la infección) los b. tipo A. La aglutinación producida por el suero a la concentración 1 : 100, se acepta como demostrativa de la existencia de disentería, sobre todo si se producen grandes copos; al 1 : 50 la aglutinación producida en ausencia de aglutinación simultánea de los b. tíf. y paratíf., hace verosímil la existencia de disentería (con frecuencia existen aglutininas de los tipos B).

Tipo B

Bac. de Flexner: Se comporta como el tipo A en los ensayos 2, 3, 4, 5. En cambio produce enroje-



cimiento del agar-manita y del agar-maltosa (ensayo 6) y produce indol a los 3-5 días. Es poco tóxico para los animales, que pueden por esta razón inmunizarse fácilmente. La aglutinación por el suero de los enfermos, a la dilución de 1 : 100 o más alta aún, no es siempre demostrativa de la existencia de disentería, ya que el suero normal aglutina también a dichas concentraciones.

Bac. Y. Se comporta como el anterior, diferenciándose de él, en que no enrojece el agar-maltosa (ensayo 6) y la producción de indol es irregular.

Los dos b. anteriores son aglutinados hasta cierto grado, por el suero de animales inmunizados para el b. de *Kruse-Shiga* y éste a su vez puede serlo por el suero de los inmunizados con b. paradisentéricos.

En las deyecciones diarreicas se encuentran con frecuencia bacilos que sólo difieren en su poder coagulante para la leche, p. ej.; su presencia no basta, sin embargo, para diagnosticar con certeza la disentería.

13. Vibriones del cólera

Pueden cultivarse en los medios ordinarios siendo preferibles los ligeramente alcalinos. Desarrollo característico sobre la gelatina (las colonias sobre las placas tienen aspecto de montoncitos de vidrio triturado, en las picaduras hay licuación superficial con el aspecto de burbujas de aire; no obstante en los cultivos recientes se observan también colonias de color amarillo obscuro con el borde filamentosos, aisladas o entre las demás colonias). Sobre agar producen colonias transparentes azuladas. Germina abundantemente en el agua de peptona (v. pág. 22), sobre la patata sólo se desarrolla cuando se ha hervido aquélla con



sol. de cloruro o de carbonato sódicos (v. pág. 26 aprt. 2). Llevan un cirro terminal. Movimientos rápidos que recuerdan los de los emjambres de mosquitos. No forma esporas. Los cultivos dan la reacción del nitroso indol (v. pág. 49) no poseen fosforescencia (v. pág. 51).

Se *tiñen muy bien*, sobre todo con sol. de fuchina; con el método de Gram se decoloran.

Diagnóstico diferencial para el vibrión del cólera y otros análogos: Resulta posible a veces ya por la observación de las colonias sobre gelatina y por la reacción del nitrosoindol, así como por la fosforescencia; el diagnóstico es rápido y seguro únicamente empleando la suerorreacción en forma de aglutinación (o por el ensayo de *Pfeiffer*). v. pan. III.

Diagnóstico bacteriológico del cólera en el hombre. (v. instrucción del consejo federal alemán de 9 Dic. 1915, V. K. G. A. 1916. p. 210). El número de institutos autorizados para hacer el diagnóstico en Alemania es limitado.

Para el análisis se toman 10-20 cc. de la deyección o bien el contenido de una porción intestinal de la parte más baja del íleon, de unos 10 cm. de longitud. En los casos antiguos se toman 3 cc. de sangre venosa obtenida por punción o mediante ventosas.

I. ANÁLISIS DE LAS DEYECCIONES, DEL CONTENIDO INTESTINAL Y DE LOS VÓMITOS

1. *Cultivos.*

a) Se diluye 1 cc. de material en 50 cc. de agua de peptona caliente y se incuba en matracitos. En los primeros casos se siembran tres de estos matraces *in situ*. Pueden también sembrarse cantidades mayo-



res, p. ej. el contenido de todo un repliegue intestinal en 500 cc. de agua de peptona.

b) Se distribuyen 4-6 öses del material sobre una placa Dieudonné (v. pág. siguientes) mediante una espátula de cristal y con esta misma se frota otra placa igual y otras dos de agar, consecutivamente. Las placas deben desecarse previamente. En los casos de mucha importancia, se hacen dos series de placas. Si no se dispone de *agar-Dieudonné* se siembran sólo las de agar simple, tomando para la primera 1 sola öse de material.

2. *Análisis microscópico.*

Se preparan frotos preferentemente con los copos mucosos, se tiñen con fuchina fenicada (v. pág. 64) dil. al 1 : 10; simultáneamente se observa en gota suspendida en agua de peptona en seguida y al cabo de 30 minutos de estufa. La presencia de abundantes vibriones hacen sospechar que se trata de cólera.

3. *Continuación del análisis.*

A las 5-8 horas de germinación se toman 4 anillas de la superficie del agua de peptona y se extienden sobre una placa *Dieudonné*, con una espátula que luego se pasa sobre 2 placas de agar. La operación se repite a las 18-24 horas de germinación. Si se han dispuesto varios matrascitos de agua de peptona, la siembra se hace con los que resulten más sospechosos al examen microscópico.

Se examinan las placas a las 8-16 horas de germinación. Se ensaya la aglutinación de los vibriones del cólera sobre portaobjetos, en una gota de suero anticolérico diluído al 1 : 100 (v. más abajo); si se trata del primer caso, se hace *in situ* un cultivo puro y se ensaya la aglutinación (v. más adelante). El cultivo se conserva.

4. *Juicio crítico de los resultados.*

El diagnóstico depende del resultado de la agluti-



nación.—Si el análisis bacteriológico resulta negativo en tres días consecutivos, pueden considerarse los convalecientes como no contagiosos. Los individuos sospechosos dejan de serlo. En los sospechosos de contagio basta obtener resultado negativo en dos ensayos hechos con un día de intervalo.

II. ANÁLISIS DE LAS AGUAS

Se agita un litro de agua con 100 cc. de sol. conc. de peptona (v. pág. 22) y se distribuye en matraces, en porciones de 100 cc. A las 8-24 horas de incubación se hacen preparaciones con el líquido superficial y del matraz donde sean más abundantes los vibrios se disponen placas *Dieudonné* y de agar, haciendo en examen como en 1.

III. COMPROBACIÓN DE CASOS DE CÓLERA ANTIGUOS

Se hacen diluciones graduales del suero en sol. de CINa al 0,85 %, y se ensaya el poder aglutinante sobre variedades conocidas de v. colérico (v. la técnica, pág. 119). En caso de no obtener resultado manifiestamente positivo, se hace a continuación el ensayo de Pfeiffer:

Se mezcla 1 cc. de suero diluido con 20, 100 y 500 cc. de caldo, añadiendo a cada una de las mezclas una anilla de un cultivo de cólera en agar; de 16-20 horas, inyectando en el peritoneo de un cobaya distinto cada una de las mezclas. Al cobaya testigo se le inyecta 1 anilla del cultivo en 1 cc. de caldo. Se preparan gotas suspendidas con el contenido intraperitoneal a los 20 y los 60 minutos. Si en los inyectados con suero se forman núcleos o se disuelven los vibrios y en el testigo, en cambio, la germinación ha



producido abundantes vibriones movibles, se trata de casos antiguos de cólera. El resultado negativo total, no hace desaparecer la sospecha (v. la técnica, pág. 108).

IV. MEDIOS DE CULTIVO

1. *Agua de peptona*, v. pág. 22.

2. *Agar*, preparado según la pág. 17, con 3 % de agar, alcalinizado con 30 cc. de sol. de carbonato sódico cristal., al 10 %.

3. *Agar-Dieudonné*. Se hierve durante 45 minutos una mezcla de partes iguales de sangre de buey desfibrinada (agitándola con perlas de vidrio) con potasa normal. Se conserva varios meses en frascos cerrados (de preferencia, debajo de una capa de parafina líquida). Se mezclan 30 partes del anterior con 70 de agar neutro y se distribuye en placas. Estas deben dejarse en reposo unas 24 h., ya que antes impiden la germinación; en caso necesario se desecan 30 minutos en la estufa antes de sembrarlas. Las placas preparadas con la sangre alcalina, conservada algún tiempo debajo de parafina, pueden utilizarse en seguida. Las placas que lleven más de 8-10 días de preparadas, no deben usarse ya.

Cuando no se disponga de placas de reserva, pueden prepararse para uso inmediato, del modo siguiente (*Esch*): se pulveriza en un mortero 5 gr. de hemoglobina comercial, se disuelve en 15 cc. de sosa normal diluida en su vol. de agua, se esteriliza en autoclave 1 hora y se le añaden por cada 15 cc., 85 de agar neutro.

(Pueden verse otros medios de cultivo para el vibrion del cólera en: *Aronson*, D. m. W. 1915, n.º 35 y 37. *Lange*, Zeit. f. Hyg. 81, pág. 138).



V. MODO DE EJECUTAR EL ENSAYO DE AGLUTINACIÓN EN LOS CULTIVOS SOSPECHOSOS

La aglutinación debe ser positiva hasta la dilución 1 : 2000 para el suero de conejo, y al 1 : 5000 para el de caballo; al 1 : 100 ha de ser *instantánea*.

En cada caso, se hacen *ensayos de comprobación* con,

1. El cultivo ensayado y el suero normal del mismo animal a concentración 10 veces mayor.

2. Con el cultivo y la sol. de CINA utilizada en las diluciones (algunas veces los vibriones jóvenes recién sembrados del cuerpo animal, se aglutinan con la sol. de CINA; debe repetirse con los cultivos germinados 12-15 horas).

a) *Ensayo en gota suspendida.*

Se dispondrán gotas, con la dil. que aglutina todavía instantáneamente los vibriones verdaderos y con una 5 veces más concentrada. El cultivo que se examina será de cólera si se aglutina a 37°, a los 20 minutos lo más tarde (obsérvese con débil aumento, no debe confundirse la aglutinación con las aglomeraciones accidentales de vibriones).

b) *Ensayos en tubos.*

Se disponen por lo menos cuatro diferentes diluciones de suero que alcancen hasta el límite del título. Se mezcla bien con el cultivo tomando una anilla de éste por cada cc. de suero (v. cap. VIII). Examínese en seguida y después de 1 h. de incubación. Sólo se considerarán como positivas las aglomeraciones bien definidas y en serie gradual hasta casi el límite del título y con enturbamiento homogéneo del tubo testigo. (V. la técnica, pág. 111).



14. Bacilo de la peste bubónica

(V. las instrucciones del consejo federal alemán, para combatir la peste; Berlín, 1905). La conservación de cultivos vivos de peste, así como los ensayos de cultivos y sobre animales, hecho con el b. de la peste, están restringidos en Alemania a cierto número de laboratorios instalados especialmente para ello; en la práctica, sólo se permiten ensayos de cultivos para confirmar el diagnóstico en los casos sospechosos.

Como material de ensayo se utiliza principalmente el líquido o el pus de los bubones (extraído con una jeringuilla o mediante incisión), la sangre, los esputos y la secreción faríngea. Se tiñe con las soluciones ordinarias. Para la coloración polar debe fijarse la preparación seca con alcohol absol. 25 minutos, (o mejor aún, se vierte encima el alcohol gota a gota y al cabo de un minuto se expulsa el residuo calentando) y se tiñe empleando de preferencia sol. acuosa diluída de azul de metileno. Germina sobre agar, suero de sangre y gelatina (débilmente alcalinos; si el material es impuro, lo mejor es la gelatina). El desarrollo es bastante lento en la primera generación (las colonias tardan 48 ó más horas hasta resultar visibles). Bacilos pequeños inmóviles, que se decoloran por el Gram, en el agar con 3 % de ClNa presenta formas de involución (formas retorcidas o hinchadas), en el caldo forma cadenas, no hace fermentar el azúcar y no licua la gelatina. Es patógeno para las ratas, cobayas y otros animales, infectados por cualquier procedimiento; en los cobayas basta frotarles sobre la piel afeitada; se distinguen por estas propiedades y por la aglutinación de los bacilos análogos hallados en las ratas muertas espontáneamente y de los bacilos de la septicemia hemorrágica. Se aglutina por el suero de



los animales inmunizados; el de los convalecientes de peste no muestra acción constante; no obstante resulta siempre positivo a la dilución de 1 : 501 : 10.

15. Bacilos de la septicemia hemorrágica

Los gérmenes productores del cólera de las gallinas, de la peste de los cerdos y de las vacas y de la neumonía de los becerros, son inmóviles, se tiñen bipolarmente, no toman el Gram y germinan fácilmente (no licuan la gelatina ni coagulan la leche). Para completar el diagnóstico en el cólera de las gallinas, se inyectan gallinas o palomas; en la peste bovina la inyección se hace en la oreja de un conejo. La peste en los cerdos sólo se confirma, después del hallazgo de los bacilos, si se presentan fenómenos pulmonares característicos y además si la enfermedad es efectivamente infecciosa.

En la peste de los cerdos se encuentran bacilos móviles con cirros peritricos, que se tiñen en los polos con más intensidad, no toman el Gram y son análogos en los cultivos al b. paratífico B; se encuentra también en el intestino de los cerdos sanos resultando entonces saprofitos para los animales de laboratorio (conejos, cobayas y ratones). Producen un virus filtrable.

16. Bacilo del mal rojo del cerdo

Los gérmenes son inmóviles muy finos y toman el Gram. Las colonias en agar son parecidas a gotas de rocío; sobre la gelatina, por picadura son parecidas a cepillos limpia-tubos. El diagnóstico se hace, por el Gram, los cultivos y por inyección subcutánea



en ratas blancas que mueren por septicemia a las 48 horas. Los órganos en descomposición no sirven para el diagnóstico porque contienen también a veces los bacilos de la septicemia de las ratas que son patógenos y no se distinguen de aquéllos.

17. Bacilo piociáneo

Se cultiva sobre todos los medios ordinarios, es móvil y con un solo cirro. Las variedades típicas producen una materia colorante verde oscura soluble en el cloroformo y que se vuelve parda lentamente (piocianina); los bacilos fluorescentes análogos no la producen. Es patógeno especialmente para el cobaya en inyección intraperitoneal. No toma el Gram. No licua la gelatina.

18. Bacilo del tétanos

Bacilos delgados, que pueden formar hilos en los cultivos; anaerobio estricto; coloración incierta por el Gram; móvil, con numerosos cirros peritricos. Se encuentra en abundancia únicamente en los puntos infectados, mezclado con otras bacterias. Lleva esporas terminales (tiene la forma de palillo de tambor) y a veces también las tiene en el cuerpo. Se desarrolla bien sobre todos los medios (adiciones, v. pág. 42), el óptimo es a 37°. Licua lentamente la gelatina y ennegrece la papilla de seso (preparada con 2 p. de seso y 1 de agua).

Para aislarlos, lo mejor es hacer inyecciones subcutáneas en varias ratas blancas, con el pus, tierra, etcétera. Si éstas mueren de tétanos, se hace un cultivo previo, anaerobio, en caldo, con el pus o el edema



a 37° durante 1-2 días. Se calienta luego el cultivo en el cual los bacilos del tétanos habrán formado esporas (compruébese al microscopio) durante 1 hora a 65-80°, para matar los gérmenes extraños, y luego se preparan placas anaerobias o cultivo alto. Si existen otros gérmenes esporígenos resulta difícil el aislamiento. En caso necesario se mantiene en la estufa durante 1 día el corazón o el bazo de la rata muerta de tétanos, preparando luego con ellos los cultivos.

Ensáyese la toxina en los cultivos filtrados.

19. Bacilos de la gangrena gaseosa, del edema maligno, bacilo Chauvoei y bacilo de la neerosis

Todos estos gérmenes son bacilos muy análogos, anaerobios estrictos. La gangrena gaseosa parece que puede originarse por diferentes especies bacterianas, que a su vez pueden presentar gran variabilidad de razas.

Para comprobar su presencia se hacen siembras anaerobias sobre agar-glucosa y agar para el cólera (v. pág. 130) o sobre agar glucosa, con 20 % de sangre humana. La acumulación resulta posible sembrando sobre caldo con fragmentos de hígado (v. pág. 41, número 1) y manteniéndolo a 37°, durante 6-12 horas. Puede hacerse también por inyección subcutánea del material, en cobayas o conejos y haciendo cultivos con la infiltración del punto inyectado y de la sangre del corazón. Para aislarlos pueden calentarse los cultivos sobre agar para el cólera, quedando las especies esporígenas (v. pág. 41. abajo).

La *aglutinación* con el suero de animales inmunizados se produce, con frecuencia, solamente en la especie inmunizante y no en las demás de la misma clase de modo que resulta difícil la diferenciación.



Para obtener suspensiones homogéneas de bacilos en los cultivos altos en agar, que están agrietados por el gas producido, se sacuden éstos del mismo modo que los termómetros clínicos, con lo que se reúne el agar tomando material de la superficie que se deslíe en sol. de CINa al 0,85 %. La aglutinación se examina en gota suspendida, agitando constantemente con la aguja de platino para evitar pseudoaglutinaciones.—El acceso de oxígeno impide la movilidad; por esta razón conviene observar la existencia de cirros, por coloración o sobre fondo negro.

La gangrena gaseosa en el hombre, aparece después de producidas heridas graves y se caracteriza por un edema subcutáneo e intramuscular gaseoso, que progresa muy rápidamente. Los gérmenes productores sólo se encuentran en los puntos infectados o a su alrededor; en los órganos internos sólo aparece *post mortem* (produciéndose también gases; órganos espumosos). El germen productor más frecuente es el de *E. Fraenkel*: forma diplobacilos o filamentos gruesos, inmóviles, esporígenos, toman el Gram y licúan la gelatina. Coagula la leche formando gases y ácido butírico. No ennegrece la papilla de seso. Es patógeno para los cobayas produciéndoles gangrena gaseosa subcutánea; no lo es para los conejos.

El edema maligno se desarrolla en el hombre y en el caballo, raras veces en el buey, en forma de edema subcutáneo e intramuscular que se propaga rápidamente, a veces con producción de gas. Los gérmenes sólo se encuentran *in vivo*, en el punto infectado y a su alrededor; en los animales inyectados llega también a los órganos internos. El germen productor típico (de *Koch*) forma bastoncillos o filamentos encorvados, móviles por cirros peritricos y no toma el Gram. Con la tintura de iodo (sol., p. 70. a 2) aparecen frecuentemente en los bacilos, gránulos azules.



Lleve esporas centrales o terminales. Licua la gelatina y coagula la leche disolviendo más tarde la caseína. No hace fermentar la lactosa y ennegrece la papilla de seso. Los gases producidos en los cultivos huelen mal. Es patógeno (por regla general) para los conejos, los cobayas y las ratas (produciendo edema y burbujas gaseosas).

El *b. Chauvoei* productor de la gangrena gaseosa en los bueyes, se presenta en forma de bastoncillos delgados móviles por cirros peritricos, no forma filamentos, no toma el Gram. Forma esporas generalmente terminales en el cuerpo mismo del animal; se le encuentra también en los órganos internos (en la hiel) y menos frecuente en la sangre. Licua la gelatina, coagula la leche sin disolver luego la caseína, hace fermentar la lactosa y no ennegrece la papilla de seso. Los cultivos huelen a ácido butírico. Es patógeno para los cobayas, menos para las ratas y no lo es para los conejos. Los cultivos resultan más fáciles añadiendo pedacitos de carne al medio utilizados.

B. de la necrosis (de Bang). Son los productores de procesos diftéricos y necróticos en los animales. Forman bastoncillos delgados y filamentos en los que se notan aglomeraciones y huecos. Los bacilos son abundantes en el borde del punto infectado; no toman el Gram; sólo resultan móviles en los cultivos jóvenes; son anaeróbios estrictos. Para aislarlos se emplean medios de cultivo con suero. Producen gases mal olientes. Inyectados subcutáneamente en el conejo producen necrosis progresiva.

20. Estafilo y estreptococos piógenos

Los cultivos se obtienen sobre todos los medios ordinarios. Optimo a la temperatura fisiológica. Los



Staph. aureus y *albus*, licuan la gelatina, el streptococo y el tetrágenus no la licua. Los cuatro toman el Gram. Las cadenas de estreptococos se forman mejor en los medios líquidos (y también en el agua de condensación del agar).

ANÁLISIS DE LA SANGRE EN LAS INFECCIONES CÓCICAS, ESPECIALMENTE EN LA SEPTICEMIA Y EN LA PIELMIA: Se toma sangre de la vena mediana con la jeringuilla (v. cap. VII, 1). Se siembra inmediatamente en porciones de 2-3 cc., en tubos de agar calentado a 45° y se vierte en placas. El cultivo, a 37°. (Deben hacerse también cultivos anaerobios en capa alta (véase pág. 42, n°. 2 a), porque existen también cocos patógenos anaerobios.) Se obtiene los siguientes resultados:

Con el *Streptoc. pyogenes et erysipelatis (longus)*. las colonias son claras con borde ancho (hemolisis).

Con el *Streptoc. mitis* (raro) se forman colonias muy pequeñas, verdosas, con el borde pequeño o sin reborde. Por regla general son saprofitos para los animales.

Con el *Streptoc. mucosus* se obtienen colonias delicadas, verdes, mucosas (es raro; se presenta algunas veces en la neumonía). Los cocos están provistos de cápsulas. Muy patógeno para los animales.

El *Staphyloc. pyogenes* forma colonias grandes con el reborde claro (lo mismo dan los cocos de la botriomicosis equina).

Los *gonococos* producen pequeñas colonias verdegrisáceas sin reborde.

Los *neumocos* dan lo mismo.

- Los estreptococos de los ganglios del caballo se desarrollan principalmente en suero (formando gotas mucosas) y en los medios con suero, calentados a 37°. Por lo demás resultan iguales al streptoc. pyogenes; lo mismo se comporta el *streptoc. mastitis* de la vaca.



21. Neumococos y neumobacilos

El modo más fácil de obtener cultivos puros de neumococos, consiste en inyectar subcutáneamente con esputos neumónicos, conejos o ratas, y sembrar la sangre del animal muerto de septicemia a las 48 horas, en agar, agar-suero o en suero. Puede obtenerse también de modo análogo a partir de la saliva de muchos hombres sanos. Desarrollo óptimo a 37° (formando pequeñas gotas de rocío en el agar), no germina a menos de 20°. Los cultivos deben renovarse cada 6-8 días porque se mueren fácilmente; no obstante en la sangre, se conservan los neumococos durante meses enteros (v. pág. 37, 2.º parr.)

Los neumococos (de *A. Fraenkel*), que se tiñen por los métodos ordinarios, toman el Gram; en cambio los neumobacilos (de *Friedländer*) no lo toman. Estos últimos se desarrollan aún a la temperatura ordinaria, dando un cultivo claviforme en la picadura en gelatina; sobre el agar forma un depósito mucoso blanco. Son mayores que los neumococos, tienen forma de bacilo, e inyectados subcutáneamente en las ratas producen también septicemia. La coloración de las cápsulas puede hacerse en ambos, en las preparaciones directas del animal (v. los métodos, pág. 74).

Los neumococos sólo se distinguen de muchos estreptococos piógenos, por su forma de llama de bujía, su tendencia a formar diplococos, con cápsulas, por la formación de cadenas cortas en los medios líquidos, porque no presentan hemólisis (v. pág. 137, cap. 20) y porque se disuelven en pocos minutos añadiendo a los cultivos de 24 h. en caldo, un volumen igual de sol. al 10 % de taurocolato sódico, no disolviéndose en cambio los estreptococos piógenos (ni el mucosus). El fenómeno se puede observar bien en gota suspendida.



22. Meningococos

Sólo germinan a más de 20°. Las siembras (de pus cerebral, líquido cerebro-espinal, moco nasofaríngeo (v. cap. VII, n.º 3) se hacen principalmente sobre agar-sangre según *Esch.* (C. R. I. Or. 52, p. 150) preparado con 60 cc. de agar con 1 % de peptona + 20 cc. de sangre de carnero desfibrinada + 10 cc. de líquido ascítico + 1,0 gr. de maltosa disuelta en 3 cc. de caldo estéril; o bien en agar con sangre humana (agar con 20 % de sangre y 2 % de glucosa). También resulta a propósito el agar-ascites (agar con 20 % de líquido ascítico y 2 % de glucosa), el suero de *Loeffler* (p. 25) y el agar *con placenta*, obtenido mezclando con 1 de suero de buey, 3 partes de la preparación siguiente: agua de placenta 1 + 2 de aq. con 1 % de glucosa, 0,5 % de ClNa, 2 % de nutrosa, 2 % de peptona Chapoteaut y 2,5 % de agar (*Kutscher*, C. B. I. Or. 45, p. 286). Conradi recomienda centrifugar el líquido obtenido por punción lumbar, calienta a 45° la parte líquida separada la mezcla con 3 partes de agar calentado a la misma temperatura, lo distribuye en placas y lo siembra con el sedimento de la centrifugación. La primera generación resulta débil, las siguientes son más abundantes. Los cultivos deben conservarse húmedos (mediante dedal de goma) y a 37°; de lo contrario mueren rápidamente. Debe sembrarse diariamente al principio y luego cada 5-7 días. Forman película y enturbiamiento en el caldo (los gonococos no se desarrollan en él).

No toman el Gram. Son de forma análoga a los gonococos, agrupándose como éstos, por regla general, en diplococos, dentro de cápsulas. En caso de que los cocos sean escasos en el líquido de la punción lumbar, se calienta éste 24 horas a 37° para obtener una acumulación de aquéllos.



Resultan débilmente patógenos para los animales (ratas y cobayas) inyectados en el peritoneo.—El suero de los enfermos aglutina por regla general (la observación se hace a 37° durante 24 horas, y el resultado se considera confirmativo a más de 1:50). Para el diagnóstico deben hacerse cultivos y la aglutinación con suero de animales inmunizados (observando durante 24 horas a 37 y a 55°).

El micrococus catarralis que se encuentra en la nariz y en la faringe, se parece por su forma al meningococo, no toma el Gram, pero se desarrolla bien sobre el agar ordinario, también sobre gelatina, sin licuarla, y se diferencia ante todo, como los otros cocos análogos, por los ensayos de aglutinación.

Se utiliza además para diferenciarlos el agar azucarado, con tornasol (*Lingelsheim*, Klin. J. XW., p. 410 *Rothe* C. B. Or. 46 p. 645) preparado como sigue: Se hierve durante 2 minutos una sol. de azúcar al 10 % con sol. de tornasol de Kahlbaum y después de fría se añade 0,5 cc. de sol. de CO_3Na , normal por cada 10 cc. Luego se añade 1,5 cc. de este último a 13,5 cc. de una mezcla de tres partes de agar al 3 %, con una de líquido ascítico, se distribuye en cápsulas y se siembra por estría. Los meningococos enrojecen solamente las mezclas preparadas con dextrosa o maltosa, los gonococos sólo la dextrosa y otros cocos (p. ej. el microc. catarr.) no enrojecen éstos ni los preparados con levulosa.

23. Gonococos

No se le puede cultivar sobre los medios ordinarios (a lo sumo germinan las últimas generaciones). Como medios especiales se utilizan los siguientes, sobre los que los gonococos se desarrollan formando.



colonias pequeñas, parecidas a gotas de rocío, a los 36° (no es conveniente operar a temperaturas más altas).

1. *Agar con suero de sangre humana o agar ascítico según Wertheim.* Se prepara mezclando partes iguales de agar neutro con suero o ascites y se siembra por frote superficial. Es indispensable que la superficie esté húmeda.

2. *Agar recubierto de sangre según Abel.* La siembra se hace sobre agar recubierto con un poco de sangre tomada del enfermo o de otra persona, teniendo cuidado de desinfectar la piel y de quitar con agua y algodón estériles todo el desinfectante antes de producir la hemorragia. La primera generación no va siempre bien; el método es recomendable por su sencillez y la facilidad de renovar los cultivos.

3. *Medios con nutrosa según Wassermann.* Se mezclan en un matraz, 15 cc. de suero de sangre de cerdo 30-40 cc. de agua, 2-3 cc. de glicerina y 0,8 gramos de nutrosa hirviendo la mezcla 15 minutos, agitándola continuamente. Al siguiente día se repite la ebullición otros 15 minutos, agitando. Se mezcla luego con un volumen igual de agar peptonado al 2 %, se distribuye en cápsulas y se siembra por frottes. Muy recomendable para las resiembras.

Los gonococos se distinguen de los meningococos, que son muy análogos, por el punto donde se encuentran, por los cultivos sobre medios azucarados con tornasol (v. más arriba) y porque no se desarrollan en los medios ordinarios de cultivo.

La coloración de los gonococos en las preparaciones hechas con pus, etc. (aparecen como diplococos en forma de panecillo, muchas veces dentro de las células de pus), puede hacerse con los colores ordinarios de anilina, especialmente el azul de metileno de



Loeffler (p. 65) o puede teñirse por contraste por los métodos de la p. 68 I-III, según *Giemsa*, (p. 151) y resulta mejor aún por el método de *Unna-Pappenheim* (p. 98). Los gonococos no toman el Gram.

En las secreciones pobres en gonococos (de gonorreas antiguas, p. ej.) se hacen frotos gruesos tiéndolos luego, si es necesario incluso según Gram, (debe tenerse cuidado en este último caso de no lavar con agua después de decolorar con alcohol).

24. Actinomicetes

Pueden obtenerse cultivos sobre los medios ordinarios especialmente sobre agar glicerinado y sobre suero de sangre tomando el pus de las glándulas actinomicóticas. Deben hacerse muchos cultivos, algunos de ellos anaerobios, ya que muchas razas se desarrollan mejor en ausencia de aire. Las drusas deben desmenuzarse con un poco de caldo antes de hacer la siembra. La germinación es generalmente lenta en la primera generación; las demás son más exuberantes. Las colonias al principio secas, muy adherentes al medio, se vuelven luego blancas o amarillas pulverulentas, y diseminadas. Se desarrollan también sobre gelatina a la temperatura ordinaria, licuándola lentamente, lo mismo que el suero. (Las formas mazudas son raras en los cultivos, los jóvenes aparecen en forma de cocos o de bacilos, los antiguos en forma de filamentos largos).

Para el *diagnóstico*, lo mejor es buscar los grumitos del hongo en el pus y aplastarlos sobre un portaobjetos, observándolo sin teñir (en caso necesario se aclara con un poco de ácido acético).

La coloración puede hacerse por los métodos ordi-



narios, pero no resulta muy bien para los hongos en los cortes; por esto es preferible *teñir por contraste*.
a) Según Gram (v. pág. 70). Los cortes se tiñen durante 24 horas (pueden dejarse previamente durante algunos minutos en potasa al 0,01 %). A continuación se tratan por sol. de yodo, durante 15 minutos. La coloración de contraste se hace con eosina o con vesubina.—De este modo se tiñen bien los filamentos centrales y las mazas no tanto.

b) Según *Weigert* (v. pág. 73). El centro de las drusas (filamentos) quedan azules las mazas y los tejidos se tiñen en rojo.

c) Según *Boström*. 1. Teñir durante 15 minutos con violeta de genciana-agua de anilina. 2. La preparación sin lavar, se sumerge 5-10 minutos en picrocarmín (preparado según *Weigert*, v. pág. 73). 3. Lavar con agua. 4. Decolorar con alcohol absol. hasta que los cortes tomen color rojo amarillento. 5. Aclarar con aceite de cedro, etc. El centro de las drusas (filamentos) queda de color azul pálido, las mazas rojas y los tejidos amarillo-rojizos.

25. Levaduras y aftas

Germinan bien en los medios de cultivo azucarados, débilmente ácidos; los mejores son la cerveza sin fermentar, bien esterilizada, el cocimiento de ciruelas pasas y el mosto de uvas con agar o bien gelatina preparada con agua corriente, sin otra adición. Se aíslan por el método de las placas (v. pág. 31 y siguientes), o bien disponiendo cultivos *monocelulares*, del modo siguiente: Se prepara una dilución grande en gelatina y se disponen sobre un mismo cubreobjetos varias gotas suspendidas, pequeñas; se examina con pequeño aumento marcando con un punto de tinta

las gotas que sólo contienen *una célula*, haciendo siembras con las colonias desarrolladas en dicha gota.

La coloración se hace con los colores de anilina ordinarios.

Los núcleos se tiñen por el método de Möller: 1. Se sumergen las preparaciones durante 2 horas por lo menos, en una solución de sulfato férrico amoniacal al 3-4 %. 2. Se lava con agua. 3. Se tiñe durante media hora con sol. saturada de hematoxilina en agua potable. 4. Se lava con agua. 5. Se diferencia en la sol. 1, durante $\frac{1}{2}$ -2 minutos siguiendo toda la operación al microscopio. 6. Se lava con agua, se deja secar al aire y se monta en bálsamo del Canadá.

La coloración de las esporas se hace según la página 75.

Reconocimiento de las levaduras en los tejidos organizados, según O. Brusse: 1. Se tiñe durante 15 minutos con sol. de hemateína Grübler. 2. Se lava con agua durante 5 minutos 3. Se tiñe con fuchina fenicada Ziehl (v. pág. 65), diluída al 1 : 20, durante 30 minutos a 24 horas. — 4. Se diferencia primero con alcohol al 60 %, luego con alcohol absol., aceite de cedro, etcétera. Los núcleos celulares quedan azules, las levaduras (no todas) se tiñen de color rojo claro, brillante.

26. Mohos y otros hongos

Para cultivar los *mohos* se emplean los medios ordinarios utilizados para las bacterias, aun sin neutralizarlos, y además la papilla de pan (v. pág. 28) y los medios indicados en el número 25, pág. 144, para el cultivo de las levaduras. De los mohos más comunes los *Penizillum* se desarrollan, por regla general, sólo a la temperatura ambiente; algunos *Aspergillus*

10.—Téc. BACTER.



y varias especies del género *Mucor*, se desarrollan a la temperatura fisiológica; en inyección intravenosa algunos de ellos son patógenos para los conejos.

Para el examen microscópico se observa a ser posible, en primer término, el hongo junto con el medio sobre el que se desarrolla, empleando pequeño aumento, y luego, se examina parte del hongo colocado entre un cubre y un portaobjetos, sin adición de agua. Cuando quiera observarse dentro de un líquido, un hongo desarrollado en el aire, no debe utilizarse el agua porque no lo moja, humedeciéndolo en cambio con la mezcla siguiente: alcohol y amoníaco concentrado aa 25, glicerina 15, aq. dest. 35 (en caso necesario se añade 1 de gelatina que se disuelve previamente en el agua, calentando). Para conservar la preparación se cierra con lacre el borde del cubreobjetos. La gelatina glicerizada que se indica en el cap. X, A puede utilizarse también para montar las preparaciones.

Para teñir los mohos se emplean colores básicos de anilina; los cortes pueden teñirse con el azul de metileno de *Loeffler* (v. pág. 65), p. ej.

El reconocimiento del arsénico por medio de los hongos se hace del modo siguiente: se mezcla la sustancia analizada con gran cantidad de cortezas de pan moreno, en un matraz, neutralizándolas previamente si es necesario. Después de esterilizar al vapor, se siembra con *Penicillium brevicaulis*; el matraz se cierra bien con algodón y un doble capuchón de goma. La presencia de arsénico se reconoce por el olor alíaceo que despiden el contenido del matraz a las 24-48 horas, cuando el penicilio se ha desarrollado ya bien (v. *Abel y Buttenberg*, Zef. Hyg. t. 32).

Los PARÁSITOS DE LA PIEL (*Favus*, tricoftos, etc.), pueden cultivarse en agar y gelatina y se tiñen del mismo modo que las bacterias. Para hacer siembras directas del cuerpo animal, se utilizan los medios re-



comendados por Plaut: aq. 100, peptona 1-2, glucosa 1, glicerina 0,5, sal común 2, agar 2. Para aislarlos se trituran los pelos, escamas, etc., con un poco de tierra de infusorios calcinada y fría, en un mortero estéril, sembrando luego placas, en la superficie, haciendo la germinación a la temperatura ordinaria o a 30°. En caso necesario se deja el material analizado durante 1-24 horas en alcohol de 50 % o más conc., consiguiendo de este modo que mueran todas o la mayor parte de las bacterias, quedando vivos los hongos. La siembra *in situ* puede hacerse por el sencillo método de *Plaut*: se colocan algunos cabellos enfermos o algunas escamas de piel sobre un porta-objetos y con otro se aplastan bien, separándolo luego y cubriendo la preparación con un cubre estéril que se fija mediante unas gotitas de cera. Debe evitarse siempre toda adición de agua. La preparación se coloca en una camará húmeda (v. pág. 32, final; la humedad debe ser tal que permita correr fácilmente al cabo de 24 horas una etiqueta pegada con goma). Los hongos se desarrollan bien, en cambio las bacterias que puedan existir germinan poco o nada. A los pocos días se hacen siembras del borde del hongo.

27. Amibas

Pueden cultivarse muchas especies de las mismas, alojadas en el agua, en la tierra y en el intestino; las amibas de la disentería, en cambio, no son susceptibles de cultivo. Como medios de cultivo pueden ensayarse los siguientes:

1. *Medios a base de heno y de paja.*—Se hierven 20-40 gr. de heno o de paja, en 1 litro de agua común, se filtra y se alcaliniza el líquido débilmente con car-



bonato sódico, se hierve de nuevo y se filtra.—Se transforman en medio sólido añadiéndole 1,5 % de agar antes de la neutralización.

2. *Medios a base de algas fucáceas.*—Se maceran los *fucus crispus* en caldo diluido o en agua común (en proporción de 2, 5-5 %), se hierve hasta que se disuelvan y luego se alcaliniza débilmente.

3. Los medios ordinarios de cultivo y además la combinación siguiente: agar 0,5-1,5, agua común 90, caldo alcalino 10.

No resulta posible obtener cultivos puros, por el contrario, deben existir siempre bacterias que sirven de alimento a las amibas. Si uno de estos cultivos mezclados, en los que no haya esporas, mohos ni levaduras, y en el que las amibas han formado cistos, se trata por sol. de carbonato sódico al 20 %, durante unas 72 h., se matan las bacterias; los amibocistos no se desarrollan por sí solos en los medios ordinarios de cultivo, siendo necesario añadirles las bacterias de las que ordinariamente se alimentan. (Por lo tanto cada especie amiboide necesita ir acompañada de una determinada especie bacteriana.)

El examen de las amibas se hace de preferencia sin tñir, entre un cubre y un porta o en gota suspendida, calentado en caso necesario.

Técnica especial para las amibas de la disentería: Se examinan primeramente los grumos de la deyección, lo más reciente posible, entre un cubre y un portaobjetos, añadiéndole un poco de sol. templada de CNa al 0,85 %, en caso de ser muy sólido el excremento. Las amibas se distinguen de los leucocitos y otras células del cuerpo animal, por su tamaño, sus movimientos, por la forma de los núcleos y por las inclusiones. Para tñir las preparaciones, se fijan los frotos delgados sumergiéndolos en alcohol sublimado a 60-70° (se prepara disolviendo 2 gr. de sublimado en



30 gr. de agua hirviendo y se filtra después de frío; del líquido filtrado se toman 2 partes y se mezclan con 1 de alcohol absol.) durante algunos segundos. Se lava luego con tintura de yodo dil. unos 30 minutos (la tintura se prepara con alcohol de 60 % al que se añade yodo hasta color pardo claro) y en seguida con alcohol al 70 %; finalmente se lava con agua destilada. Después de fijar se tiñe: 1. dejando la preparación 2 h. en una sol. de sulfato férrico-amoniaco al 5 %. 2. Se lava cuidadosamente. 3. Se deja 5 minutos en una sol. alc. antigua de hematoxilina al 1 %, a la que se añade sol. acuosa sat. de carbonato lítico, hasta que tome color rojo obscuro. 4. Se lava, y si es preciso, se diferencia con la sol. 1. Luego se deshidrata con alcohol y se monta en aceite de cedro. Los cortes de tejidos se tratan de modo análogo. La coloración de contraste se hace con eosina. Puede teñirse también por el método de *Giemsa* (v. pág. 151).—Las amibas de la disentería presentan ectoplasma hialino; el núcleo no se tiñe siendo casi invisible, el cariosoma teñido aparece rodeado de un halo claro y en la especie más común (entamoeba tetragena) aparecen los cistos con un núcleo cuádruple; esta última propiedad la distingue de la entamoeba coli. Conviene hacer ensayos sobre gatos.

28. Parásitos de la malaria

Para lo concerniente a la preparación y fijación de los frotos de sangre (v. cap. VII, n.º 1). Cuando los parásitos son poco abundantes (p. ej. en los casos que están en tratamiento) deben tomarse para el examen, gotas grandes (v. cap. VII, n.º 1 final).

a) Coloración sencilla según Manson:

Se disuelven 2 gr. de azul de metileno puro de



Höchst, + 5 de borax en 100 de agua hirviendo y la solución se diluye, para su uso, en un tubo de ensayo, hasta que resulta transparente. Los preparados secos recientes, se tiñen en frío durante 10-15 seg. Los antiguos se tiñen mejor con la sol. siguiente: azul de metileno 1, carbonato sódico cristalizado 0,2, agua 100. Se hace actuar en frío y durante unos 20 seg. Se lava luego con agua, quedando los parásitos teñidos en azul y los eritrocitos de color verdoso.

b) *Doble coloración según Appel* (C. B. I. Or. p. 105):

Se fija en alcohol metílico durante 1-5 minutos. Se deseca y se colorea 15-20 minutos, con la sol. siguiente: aq. dest. 100 + sol. acuosa de azul de metileno al 1 %, 1, 5 + sol. al 1 % de fuchina, 0,28. Se lava luego con agua quedando los parásitos y los núcleos de los leucocitos, azules, los eritrocitos y el protoplasma de los leucocitos, rosa.

c) *Coloración con la cromatina según Giemsa* (modificación del método *Romanowsky-Nocht*) C. B. I. Or. 37, p. 308:

1. Se fija el frote en alcohol etílico 15-20 minutos o en alcohol metílico, sólo 2-3 minutos. Se deseca con papel de filtro.

2. Se tiñe con la «sol. Giemsa para el método Romanowsky» (preparada por Grübler-Leipzig). La sol. colocada en frasco cuentagotas, que se enjuaga previamente con alcohol abs., se vierte sobre agua caliente a 30-40°, dest. y exenta totalmente de ácido, en la proporción de una gota por cc. Se agita la mezcla y se vierte sobre los frotos colocados en cápsulas, dejándola actuar 10-15 minutos o más, renovando la solución tantas veces como sea posible. (Es indispensable que todas las vasijas empleadas estén muy limpias y totalmente exentas de ácido.)

3. Se lava en un chorro fuerte de agua.



4. Se deseca y se incluye en aceite de cedro. Los parásitos aparecen de color rojo brillante, el protoplasma azul. Los núcleos de los leucocitos aparecen rojos o violáceos, con el protoplasma azul. Los eritrocitos se tiñen en color de rosa a rojo pardo.

d) *Método rápido de coloración según Giemsa* (C. B. I. Or. 73, p. 493).

1. Los frotos delgados secos al aire y sin fijar, se dejan dentro de cubetas especiales de vidrio, con la cara preparada hacia arriba y mediante un frasco cuentagotas se les vierte encima «sol. colorante-fijadora» de Giemsa, preparada por Grüber-Leipzig, hasta que quede cubierta de solución la cara preparada (bastan 8-15 gotas; debe procurarse que no rebase el borde). La cubeta se tapa y la sol. se hace actuar menos de 1 minuto.

2. Se prepara en una probeta graduada, una solución de 1 gota de líquido 1 ó del indicado en c) 2, p. 150, en 1 cc. de aq. dest. y se vierte en la cubeta, llenándola hasta cubrir totalmente el portaobjetos y *en seguida* se mezcla bien el conjunto, moviendo la cubeta, y dejándolo 10 minutos en reposo.

3. Se lava con agua, se deseca, se incluye en parafina o en bálsamo exento de ácido (de Grüber-Leipzig).

Coloración de preparaciones de cortes según Giemsa (D. m. W. 1910, núm. 12).

1. Los cortes de menos de 5 mm. de grosor, se fijan con alcohol sublimado durante 48 horas por lo menos, renovando el líquido a las 24 horas; luego se montan, etc., cogiéndolos con *una pinza de asta*. La estancia prolongada en dicha solución no perjudica el teñido.

2. Los cortes se pasan luego a alcohol de concentración creciente, luego a xilol, se incluyen en parafina, se cortan y los cortes se colocan sobre portaobjetos (v. pág. 59).



3. Se tratan de nuevo por xilol y por alcohol de dilución creciente en agua.

4. Se dejan 10 minutos en una sol. de 2 gr. de yoduro potásico en 100 cc. de agua + 3 cc. de solución de iodo-iodurada (v. pág. 70, 2).

5. Después de lavar con aq. dest., se dejan 10 minutos en una sol. al 0,5 % de carbonato sódico, lavando finalmente 5 minutos con agua común, y un instante en aq. dest.

6. Se tiñe con sol. de *Giemsa* (v. pág. 150, c 2; en caso de teñir largo tiempo, se toma una gota en 2 cc. de agua, en lugar de 1 cc.) de 2 a 12 h. (debe renovarse la sol. colorante al cabo de $\frac{1}{2}$ h.)

7. Se lava con aq. dest. y se trata sucesivamente por mezclas de acetona-xilol, en las proporciones 95 : 5, 70 : 30, 30 : 70; luego por xilol y por último se incluye en aceite de cedro. La coloración final es análoga al de la de la p. 151, c 4.—Las preparaciones húmedas sobre cubreobjetos se tratan de modo parecido.

29. Tripanosomas

Algunas especies son susceptibles de dar cultivos en una mezcla de agar y sangre de conejo desfibrinada, en partes iguales. Las siembras han de hacerse abundantes y mantener los cultivos a 20-37°. V. también *Nöller*, Arch. f. Schiffs. u. Tropenhyg. t. 21, p. 53.

Los tripanosomas vivos en la sangre se examinan en gota suspendida, añadiendo un poco de sol. de CINa al 0,85 %, o bien se extiende entre el porta y el cubreobjetos, bordeando éste con vaselina o cera. Los frotos de sangre se preparan según cap. VII, 1. tiñendo según *Giemsa* (v. p. 150 c) y d), cuando se



opere según c) 2, debe teñirse 5 minutos) o según *Loeffler*: se preparan frotos delgados y se fijan en una mezcla de alcohol-éter. Luego se vierten sobre la preparación 3 gotas de sol. al 0,3 % de arsenito sódico en aq., dest. + 1 gota de sol. acuosa al 0,5 % de «verde malaquita crist. quím. puro» (de *Höchst*) y se calienta hasta que se desprendan humos, 1 minuto, lavándolo luego en un chorro fuerte de agua. Luego se prepara en un tubo de ensayo una mezcla de 5 cc. de agua glicerizada al 0,5 %, con 5-10 gotas de la sol. *Giemsa-Romanowsky* (v. p. 150 c), se calienta la mezcla hasta ebullición y se vierte todavía caliente sobre el cubreobjetos. Al cabo de 1-5 minutos se decanta, se lava con un chorro fuerte de agua. (La mezcla de sol. *Giemsa*-glicerina puede utilizarse cuantas veces sea necesario.) El plasma de los tripanosomas queda teñido en azul, los núcleos, la membrana ondulante y los cirros, en rojo, los eritrocitos quedan de color rosa.

La coloración de las preparaciones húmedas y de los cortes se hace según *Giemsa*, (v. p. 150 y sigs.)

30. Espiroquetas de la sífilis

Las espiroquetas de la sífilis se distinguen de otras especies (*Spir. refringens* y *balanitidis*, que se hallan en la secreción genital, y la *S. dentium* y *S. bucalis* que se encuentran en la boca) por ser relativamente difíciles de teñir, por su extraordinaria delgadez y por su forma. Presentan numerosas espiras (10-26), muy regulares en forma de tirabuzón, aun cuando estén en reposo y los dos extremos terminan en punta muy fina. Las espiroquetas vivas pueden observarse muy bien en el campo del ultra-



microscopio (p. 6); cuando están sin teñir pueden observarse también cómodamente mezclando una gota del líquido que las contiene con tinta china (v. página 39) extendiéndola en capa delgada sobre un cubreobjetos.

La germinación ha de ser anaerobia en suero de caballo coagulado, sembrando en capa alta (v. p. 42, 2, a) o también en una mezcla de agar neutro con suero de caballo en partes iguales o al 1 : 2. En los cultivos mezclados se hacen siembras de las ramificaciones más exteriores de las colonias de espiroquetas.

El reconocimiento para comprobar un diagnóstico se hace preferentemente en frotos obtenidos de chancros no curados, pústulas, etc. Para ello se limpian con una torunda de algodón empapada de éter de petróleo, y luego, comprimiéndolas fuertemente o rasgando con el canto de un cubreobjetos, se hace salir un poco de suero que se extiende sobre un portaobjetos.

Para teñir los frotos no pueden seguirse los métodos ordinarios, en los que el colorante debe actuar por espacio de algunas horas, aplicándose en cambio los métodos siguientes:

a) Según *Giemsa* (D. m. W. 1905 núm. 26, 1907 número 17):

1. Se fija con alcohol o sobre la llama, pero teniendo mucho cuidado. En las preparaciones antiguas es el del todo indispensable la fijación.

2. Se tiñe durante 30-60 minutos, del modo indicado en la p. 150, c), pero sin calentar; en el núm. 2 de dicho procedimiento, conviene añadirle al agua 1-10 gotas de sol. de carbonato potásico al 1 %, antes de añadir el colorante.

3. Se lava brevemente con agua exenta de ácidos. Las espiroquetas aparecen teñidas de rojo obscuro intenso, el fondo queda incoloro o rojizo, las



células azules, los núcleos rojos, y color rosa los eritrocitos.

b) *Coloración rápida según Giemsa.* Se procede según se indica en la pág. 151 d), con la única diferencia de teñir durante 5 minutos en el núm. 2.

c) Según *Loeffler*: se procede de modo idéntico al indicado para los tripanosomas, pág. 152.

Coloración en los cortes según Levaditi (Hoffmann, D. m. W. 1906, n.º 22.)

1. Los cortes de 2 mm. de grosor a lo sumo, se fijan durante 24 horas en una mezcla de formalina 1 + agua 9.

2. Se dejan unas 15 horas en alcohol de 96 %.

3. Se dejan luego en agua destilada hasta que los cortes se vayan al fondo. El agua debe renovarse varias veces.

4. Se suspenden los cortes mediante hilos, en una mezcla reciente de 90 cc. de nitrato argéntico al 1, 5 %, con 10 cc. de piridina purísima, guardándola en un frasco de vidrio oscuro de tapón esmerilado y manteniéndolos 1-6 días a 37°.

5. Se lava luego un instante con piridina al 10 %.

6. Se pasan los cortes a una mezcla reciente de 90 cc. de sol. al 4 % de ácido pirogálico, + 10 cc. de acetona; de esta sol. se toman 85 cc. y se les añade 15 cc. de piridina purísima, guardando la mezcla en frascos oscuros de tapón esmerilado y dejando en ella los cortes de 15-48 horas. Antes de colocar los cortes en el frasco, conviene lavarlos en la cámara oscura con un poco de la misma solución.

7. Se lava con agua, luego con alcohol diluido, alcohol absol. y xilol, se incluyen en parafina y se hacen cortes finos que se examinan directamente. Las espiroquetas quedan teñidas en negro por la plata reducida.



La coloración en preparados hechos con cerebro, se efectúa según *Noguchi*, M. m. W. 1913, página 737.

Suero-diagnóstico de la sífilis

Reacción Wassermann

Principio: El suero de los sífilíticos inactivado la acción del calor, puesto en contacto con extracto de un tejido sífilítico (y de sol. de lipoides) se une a los complementos del suero normal de cobaya, con lo cual impide que, al añadirle una mezcla de glóbulos rojos con suero hemolítico inactivado, se disuelva la hemoglobina.

Aclaración: Ciertos cuerpos albuminoideos o sus productos de desintegración, designados con el nombre de *antígenos*, tales como p. ej., las bacterias, las toxinas, los glóbulos rojos, inyectados en el cuerpo de un animal apropiado, dan origen a determinadas sustancias conocidas con el nombre genérico de *anticuerpos*, los cuales actúan a su vez sobre el antígeno que los origina y no sobre los demás, pudiendo manifestarse su acción de diversas maneras (p. ej., como antitoxinas, hemolisinas, aglutininas, etc.). También se producen dichos anticuerpos en el cuerpo del hombre o de los animales que padecen una infección natural, p. ej., las aglutininas, en los que padecen el tifus (v. la reacción Widal, pág. 118).

Muchos anticuerpos pierden su influencia al calentarlos $\frac{1}{2}$ hora a 55°; pero la recobran de nuevo al añadirles suero reciente de un animal sano. En el suero de los conejos, a los que se ha inyectado, p. ej., glóbulos rojos de cordero (o sea un antígeno), se originan hemolisinas como anticuerpos, de modo que el suero de dichos conejos, aun estando muy diluido,



disuelve los glóbulos rojos del cordero, dejando libre la hemoglobina. Calentando el mismo suero $\frac{1}{2}$ hora á 56°, ya no disuelve los eritrocitos, es decir, que ha quedado *inactivo*. Si al suero inactivo, mezclado con la sangre de cordero, se le añade una pequeña cantidad de suero reciente de un animal normal, de preferencia un cobaya, se disuelven de nuevo los glóbulos rojos.

A los anticuerpos existentes en el suero de un animal en tratamiento, que han sido inactivados por la acción del calor, se les denomina *ambozeptores* y al suero normal de cobaya que añadido a los ambozeptores, les devuelve la actividad, se le llama *complemento*. La mezcla de glóbulos de carnero + los ambozeptores + el complemento, indicada en el anterior ejemplo, se le denomina *sistema hemolítico*; la acción de añadir el amboceptor a los glóbulos rojos, se denomina *sensibilización* de estos últimos.

Al añadir el complemento más conveniente a una mezcla de un antígeno, con el anticuerpo correspondiente, inactivado (amboceptor), los tres productos forman una combinación fija: el complemento no queda libre (o disponible), sino que queda combinado (fijado). Así, p. ej., si se mezclan bacilos tíficos con suero inactivado de un animal, al que previamente se le han inyectado cultivos tíficos, y a la mezcla se le añade a modo de complemento, suero reciente de un cobaya, este último queda unido a la mezcla al cabo de algún tiempo de reposo; por esta razón, si se añade luego a la mezcla una nueva cantidad de glóbulos de carnero sensibilizados (es decir, una mezcla de glóbulos de carnero con el amboceptor correspondiente, o sea suero inactivado de un conejo, tratado previamente con sangre de cordero) los glóbulos *no se disuelven* porque el complemento necesario queda empleado en la combinación entre los b. tíficos y el



suero tífico inactivado. En cambio, si se mezclan los b. tíficos con suero anticolérico inactivado (o sea suero de un animal tratado previamente con vibrión colérico, calentado) y con el complemento, y después de un algún tiempo de reposo se le añaden glóbulos rojos de carnero, sensibilizados, estos últimos se disuelven, porque los b. tíficos y el suero anticolérico no se corresponden, con lo cual el complemento queda libre para actuar.

De lo que precede se deduce claramente que, al realizar los ensayos en condiciones perfectamente determinadas, puede deducirse de ellos si un antígeno conocido se combina o no con un suero desconocido que actúe como ambózeptor y viceversa. Si los glóbulos rojos no se disuelven, el antígeno y el suero, se corresponden; en caso contrario, no. Si se mezcla el extracto de un órgano sífilítico (antígeno) con suero humano inactivado por el calor, se le añade el complemento y después de algún tiempo, se añaden además los glóbulos rojos de carnero sensibilizados, estos últimos quedan sin disolver en caso de que el suero proceda de un individuo sífilítico, es decir, en caso de que el suero contenga anticuerpos sífilíticos; si, por el contrario, el suero procede de un individuo sano, los glóbulos rojos se disuelven.

Modo de ejecutar la reacción. Se necesitan:

1. El *antígeno*, constituido por un extracto acuoso o alcohólico de hígado de un feto sífilítico. Puede utilizarse también, para los ensayos prácticos, extracto alcohólico de un órgano sano (p. ej. corazón de cobaya, hígado de hombre normal; la preparación se hace añadiendo por cada gramo del órgano, bien picado, 50 cc. de alcohol de 96 % y calentando 1-2 días a unos 60° agitando con frecuencia y filtrando luego). Cada suero debe ensayarse siempre con diversos extractos, debiendo dar la reacción con todos



ellos, en caso de que el diagnóstico de sífilis deba considerarse como positivo. La cantidad de antígeno que deba emplearse se determina previamente mediante un suero sifilítico comprobado.

2. El *líquido orgánico seroso* que quiera analizarse (suero sanguíneo, líquido ascítico, lumbar, etc.). Se precisan unos 2-3 cc. del mismo, inactivándolo por calefacción a 55° durante $\frac{1}{2}$, a 1 hora (en la estufa o en baño de agua) lo más pronto posible después de obtenido; el suero sanguíneo en especial, debe separarse inmediatamente del coágulo e inactivarlo. Los líquidos inactivados, después de esterilizados y conservándolos en la nevera, pueden utilizarse durante varios días para efectuar la reacción. El líquido cerebroespinal no es necesario inactivarlo porque carece de complementos.

3. El *complemento*, constituido por suero de un conejo normal, reciente, no calentado y centrifugado (exento de glóbulos rojos) (v. en el cap. VIII el modo de tomar la sangre). El suero conserva su actividad solamente durante un día y se le emplea diluido en solución de ClNa al 0,85 %, a 1 : 10.

4. Una suspensión *de glóbulos rojos de carnero*, lavados. Se prepara esta centrifugando sangre de carnero reciente y desfibrinada, marcando previamente en el tubo de la centrífuga el volumen que se quiere obtener; luego se decanta el suero reemplazándolo por sol. de ClNa y agitando y centrifugando de nuevo. Se repite el tratamiento varias veces, añadiendo finalmente sol. de ClNa hasta la señal. Para los ensayos se toman 5 cc. de esta suspensión concentrada, diluyéndolos en 95 cc. de sol. de ClNa.

5. El *ambozeptor hemolítico*, constituido por suero de un conejo al que se han inyectado previamente glóbulos rojos de carnero. El tratamiento se efectúa inyectando en la vena auricular (v. cap. VIII) 5 cc. de



la suspensión de glóbulos rojos preparados, según el párrafo anterior (es preferible emplear la dilución al 25-50 %) y al cabo de 8-14 días se le inyectan 4 cc. más. A los 8 días de la última inyección, se extrae un poco de sangre del conejo, ensayándola y si resulta útil, se desangra completamente el animal, centrifugando el suero y añadiéndole 0,25 % de fenol. La actividad del suero debe manifestarse a la dilución de 1 : 1000 por lo menos. En la obscuridad y en sitio fresco se conserva bastante tiempo; no obstante, antes de cada ensayo debe ensayarse su actividad.

6. Suero de un sífilítico que dé patentemente la reacción Wassermann.

7. Suero de un individuo sano que no dé la reacción Wassermann.

Se empieza por determinar cada vez *el título del sistema hemolítico*. Para ello se prepara una mezcla de: la cantidad de suero 5) valorada en ensayos anteriores, una cantidad un poco menor y otra un poco mayor, diluídas cada una de ellas en 0,5 cc. de solución de CINA; 2.0,5 cc. de la suspensión de glóbulos rojos obtenida según 4); 3.0,5 cc. del suero 3) a la dilución 1 : 10; 4. 1 cc. de solución de CINA al 0,85 % (con objeto de que el volumen final sea el mismo que en el ensayo definitivo) y la mezcla se mantiene a 37° en la estufa. Luego se toma como dosis de prueba, en el ensayo definitivo, el cuádruplo de la cantidad mínima de suero 5) que ha sido suficiente para disolver los glóbulos rojos al cabo de 2 horas, a 37° (es decir, que al cabo de este tiempo quede en el tubo un líquido de color rojo sin sedimento ninguno). Al mismo tiempo, se prepara una mezcla en iguales condiciones, sólo que en vez del ambozeptor hemolítico, contiene 0,5 cc. de sol. de CINA y se ensaya con ella si los glóbulos rojos se disuelven también en ausencia del suero 5), en cuyo caso no resultan utilizables.



La *prueba principal* de la *reacción Wassermann* consta de los ensayos siguientes:

Tubo 1: se ponen en el a) 0,5 cc. de una dilución del líquido inactivado que se ensaya, en 5 veces su volumen de sol. de ClNa al 0,85 %; b) 0,5 cc. de la dilución del complemento (3); c) la cantidad de antígeno necesaria (1), diluída hasta 0,5 cc. en sol. de ClNa (este ensayo sirve para determinar la actividad del líquido examinado).

Tubo 2: a) en lugar del líquido ensayado, se toma 0,5 cc. de suero seguramente sífilítico, inactivado (5), diluído en sol. de ClNa al 0,85 %; b) y c), como en el tubo 1 (este ensayo sirve para determinar la actividad del antígeno).

Tubo 3: a) en lugar del líquido ensayado se toma 0,5 cc. de suero seguramente no sífilítico, inactivado (6), diluído en 5 veces su volumen de sol. de ClNa; b) y c) como en el tubo 1 (este ensayo pone de manifiesto si el antígeno es utilizable).

Tubo 4: a) 0,5 cc. de sol. de ClNa al 85 %; b) como en 1 (sirve para comprobar que el antígeno sólo, no impide la disolución de los glóbulos rojos).

Tubo 5: a) se toma 1 cc. de a), como en el tubo 1; b) igual al tubo 1 (sirve para comprobar que el líquido examinado, sin el antígeno, no impide la disolución de los glóbulos rojos).

Tubo 6: a) se toma 1 cc. de a), como en el tubo 2; b) como en el tubo 1 (sirve para comprobar que el suero sífilítico, sin el antígeno, no impide la disolución de los glóbulos rojos).

Tubo 7: a) se toma 1 cc. de a) como en el tubo 3; b) como en el tubo 1 (sirve para comprobar que el suero normal, sin el antígeno, no impide la disolución de los glóbulos rojos).

Todos los tubos se dejan 1 hora en la estufa, o 37°. Después de este tiempo, se añade a cada una



0,5 cc. de la suspensión de glóbulos rojos (4) y cuatro veces la cantidad de ambozeptor hemolítico equivalente al título comprobado del mismo (5), diluída hasta 0,5 cc. en sol. de ClNa (estas dos adiciones deben mezclarse previamente y añadir las reunidas). Después de mezclar bien su contenido, se dejan de nuevo los tubos 2 horas en la estufa a 37°, comprobando el resultado y después de otras 24 horas en la nevera se comprueba la lectura.

Los glóbulos rojos deben quedar siempre sin disolver en el tubo 2 (por tanto el líquido queda incoloro y se forma un sedimento rojo), en cambio deben disolverse siempre en los tubos 3-7 (en ellos queda el líquido de color rojo laca y no se forma sedimento). Si en el tubo 1 no se observa nada de disolución, resultará que se trata de un caso de sífilis, siempre que no se trate de lepra, malaria o fiebre recurrente. La disolución total y principalmente la parcial, en el tubo 1, no excluyen la posibilidad de que se trate de sífilis. Si se sospecha la existencia de ésta, debe repetirse el examen al cabo de algunas semanas. Si después de este tiempo la disolución es menor, será probable la existencia de sífilis, siempre que no se trate de casos tratados específicamente. Recíprocamente, el tratamiento específico se pone de manifiesto al repetir los ensayos, por una disminución o por la desaparición del poder inhibidor de la disolución.

Resulta conveniente efectuar siempre la reacción con varios antígenos (1).

El *líquido cerebroespinal*, puede emplearse *sin diluir ni inactivar* (v. más arriba), a la dosis de 0,5 cc.

Se han propuesto diversas modificaciones de la reacción Wassermann, entre las cuales la que más frecuentemente se sigue es la de *Stern*: en lugar del complemento de cobaya (3) se emplea en ella complemen-



to de sangre humana, utilizando el suero que va a ensayarse y que ha de ser reciente, sin inactivar, es decir, sin haberlo calentado. Las diluciones y los ensayos de comprobación se disponen de modo análogo a la reacción Wassermann, con la única diferencia de que la cantidad de antígeno (1) que se emplea es menor ($\frac{2}{5}$ ó $\frac{1}{5}$ del título hallado para la reacción Wassermann) y en cambio se toma una cantidad mayor de ambozeptor (10-12 veces la cantidad hallada como título en la reacción Wassermann). Este método no es aplicable al líquido cerebroespinal, porque éste no contiene complementos. Lo más conveniente, es aplicar el método simultáneamente con la reacción Wassermann y en caso de que las dos resulten negativas (es decir, que no haya disolución de glóbulos rojos) puede afirmarse que no se trata de sífilis. En cambio, la reacción *Stern* positiva, no prueba por sí sola la existencia de dicha afección.

Todos los productos indispensables para llevar a cabo dichas reacciones pueden adquirirse de las firmas: L. W. Gaus-Oberursel a. T. y Merck-Darmstadt.

31. Espiroquetas de la fiebre recurrente

El análisis en vivo se hace como para las espiroquetas de la sífilis; presentan las espiras menos pronunciadas; la coloración se hace como en aquéllas o como en los parásitos de la malaria (v. pág. 149); no toman el Gram. Se encuentran abundantes en la sangre en el momento del ataque. Cuando haya pasado éste, debe hacerse el examen tomando una gota gruesa, como en la malaria (v. pág. 149). La germinación tiene lugar en el líquido ascítico, en capa alta, añadiendo un fragmento fresco de un órgano animal



esterilizado (*Noguchi*, M. m. W. 1912, n.º 36). La espiroqueta de los dientes y otras espiroquetas, se desarrollan anaerobiamente a 37°, en suero de caballo con agar al 1 : 2, si se hacen las siembras como se dijo en la pág. 42, 2 a); a los 10 días se perciben las colonias en forma de un rocío o vaho.

32. Cospúsculos de la rabia canina

Método para reconocer *los corpúsculos de Negri* según *Lentz* (C. B. Or. 44, pág. 374):

1. Se toman fragmentos transversales del cuerno de Ammon, de 2-3 mm. de grosor, se fijan por el método de la pág. 61 b), se endurecen y se incluyen. Se hacen cortes, desecándolos sobre cobreobjetos (pág. 59, n.º 3) dejándolos luego 1 minuto en alcohol absol.

2. Se tiñe 1 minuto con eosina extra B, de *Höchst* (sol. de 0,5 grs. en 100 de alcohol al 60 %).

3. Se lava con agua.

4. Se tiñe durante un minuto con azul de metileno de *Loeffler* (v. pág. 65).

5. Se lava con agua y se deseca con papel de filtro.

6. Se diferencia en alcohol absolutis. 30, con una gota de sol. al 1 % de sosa en alcohol absol., hasta que el corte tome color rosa pálido.

7. Se diferencia en alcohol absol. 30, con una gota de ácido acético al 50 %, hasta que las filas de células ganglionares aparezcan de color azul pálido.

8. Se lava brevemente con alcohol absol., xilol, etcétera.

Los corpúsculos de Negri aparecen teñidos en color rojo púrpura, los corpúsculos internos quedan azules, las células ganglionares con sus núcleos, azul



claro, los corpúsculos nucleares negro-azulados, los eritrocitos rojo cinabrio.

Además, en los cortes transversales recientes del cuerno de Ammon, pueden levantarse con el escalpelo las capas de células ganglionares, y después de aplastarlas entre dos portaobjetos, los frotés húmedos todavía se fijan durante algunos minutos en alcohol metílico, se lavan con alcohol absol. y se tiñen como se ha dicho antes.

Véase además *Stutzer, Zeit. f. Hyg.* 69, pág. 25.



VII

Modo de recoger el material analizable del cuerpo del animal

Los líquidos orgánicos, secreciones y excreciones que deban examinarse bacterioscópicamente, deben recogerse y conservarse de manera, que no se contaminen por los gérmenes externos, y además que no lleguen a ponerse en contacto con desinfectantes.

En Alemania, los laboratorios públicos de Bacteriología disponen de embalajes especiales de diversos modelos, destinados a la entrega de muestras para el análisis, remitiéndoselos gratis a los médicos, a la demanda de éstos; por regla general, en las farmacias existen también depósitos de dichos embalajes.

1. SANGRE. La extracción de *pequeñas cantidades* se hace en el lóbulo de la oreja, en la parte interna del antebrazo, cerca del codo y también de la primera o segunda falange de los dedos (es poco recomendable extraer la sangre de la yema, en primer término porque es una región muy difícil de limpiar y además porque resulta muy molesta la herida de la sangría). La piel se lava con agua y jabón (o con alcohol jabonoso), luego con alcohol, éter y se seca con algodón, frotando enérgicamente para producir congestión; después de seca la piel, se pincha con una aguja o un bisturí estériles.



La sangre *se recoge* en tubos o en capsulitas estériles; cuando convenga separar el suero solo, inmediatamente después de coagulada se le quitan los coágulos con la aguja de platino. También puede separarse el suero en pequeña cantidad, empapando con sangre pequeñas torundas de algodón, que luego se suspenden de un alambrito fijo en un corcho, que cierra el tubo de la centrífuga; subiendo la torunda hasta cerca del corcho y centrifugando se reúne en la parte cónica del tubo cantidad suficiente de suero para hacer los *ensayos de aglutinación*. Otro método consiste en hacer que la sangre ascienda por una serie de tubos capilares (de 6-8 cm. de largo y 2 milímetros de diámetro, cerrados por los dos extremos. Para que penetre la sangre se rompe la punta y después de llenos se cierran de nuevo, al soplete o con la cera); centrifugando se facilita la separación del suero. Este último se extrae rompiendo el capilar por el punto de separación del coágulo del suero (haciendo previamente una señal con un cuchillo para vidrio) y se pone en contacto la boca con la punta de una pipeta de 1 cc., dividida en centésimas, ascendiendo por capilaridad el suero al interior de esta última. Hace falta reunir en la pipeta el contenido de varios capilares y luego se pasa a los tubos de dilución, en cantidades convenientes.—Las beridas de las sangrías se limpian con algodón esterilizado y se cubren con tafetán inglés.

Para obtener grandes cantidades de sangre se hacen las extracciones mediante ventosas, puestas en la espalda (la piel se limpia del modo indicado, colocando luego una ventosa seca esterilizada a la llama; la incisión se hace con un bisturí estéril, colocando de nuevo la ventosa; la herida se cierra después de la extracción, mediante un algodón estéril) o por una sangría en la vena mediana (la piel se limpia del



modo indicado, se coloca en el antebrazo un tubo de Esmarch para producir la hinchazón de la venas, dejándolo de modo que se perciba el pulso radial con claridad, y luego se introduce la jeringa esterilizada, en la vena, paralelamente al brazo; si la jeringa queda bien colocada, la sangre sube por sí sola). La sangre se siembra en seguida (estando aun líquida, en agar fundido y caliente a 42°; v. pág. 137 núm. 20). En caso de que la sangre tenga que servir tan sólo como medio de cultivo, se hace una mezcla de 1 de sangre con 3-10 de agar, o de caldo (v. pág. 104 y 142 núm. 2). *La sangre de placenta* se recoge por el extremo desinfectado del cordón umbilical y comprimiendo aquélla.

La extracción de sangre en los cadáveres se hace preferentemente del corazón, valiéndose de una jeringa con la cánula ancha y corta, que se introduce después de cauterizar con un éscalpelo caliente la superficie en el punto de la incisión.

Las *preparaciones que hayan de observarse al microscopio* se obtienen recogiendo con el borde de un cubreobjetos flameado, la gota de sangre que brota de una picadura o incisión y se extiende en seguida sobre un portaobjetos, pasando aquél por encima, formando un ángulo obtuso, una vez, a todo lo largo. Queda de este modo un frote delgado y muy homogéneo de sangre. Después de seco se fija en alcohol abs., solo o con volumen igual de éter, durante 10-15 minutos, o también en alcohol metílico durante 2-3 minutos; puede también fijarse con los vapores de ácido ósmico (v. pág. 55; la acción ha de ser breve, de lo contrario se hace difícil la coloración; debe lavarse con sol. muy diluída de permanganato potásico). La fijación a la llama deforma los glóbulos rojos.

Para reconocer los parásitos, cuando son poco numerosos, se *preparan gotas gruesas*, extendiendo la gota sobre un porta, mediante una varilla de vidrio,



de modo que quede un disco del tamaño de una pieza de dos céntimos y se deja secar al aire (protegiéndola de los insectos) *completamente*. Luego se extrae la hemoglobina sumergiendo la preparación en formol al 2 %, con 0,5-1 % de ácido acético, teniendo a continuación, sin fijar. (La coloración según *Giemsa* lleva ya incluida la extracción de la hemoglobina). Las preparaciones no deben lavarse demasiado.

2. PUS. Se extrae por punción o incisión asépticas, recogiéndolo en un recipiente estéril (tubitos, cápsulas o capilares, como para la sangre). Se preparan frotos colocando una gota sobre un portaobjetos y se extiende con otro que se pasa por encima.

3. SECRECIONES Y MEMBRANAS DE LA GARGANTA (en la angina o en la difteria). Se toca la región enferma con una torunda de algodón, sujeta al extremo de un palito de madera o de un alambre, con una òse de platino o con el extremo de una varilla de vidrio, limada y esterilizada. Resulta conveniente tener un repuesto de tubos esterilizados, dentro de los cuales se guardan las varillas o los alambres, sujetos por tapones de guata o de corcho. Para retener baja la lengua se utilizan ventajosamente unas espátulas de madera que se queman después de usadas. —*La secreción nasal* se recoge con ayuda de un espejo nasal, mediante una anilla de platino o unas pinzas con una torunda de algodón. —*La secreción nasofaríngea* se recoge mediante un tapón de algodón sujeto al extremo de un alambre de cobre flexible que se introduce por la boca. El alambre con el algodón se guarda en un tubo estéril y al momento de usarlo, se dobla dándole la forma conveniente por medio de una pinza estéril, enderezándolo de nuevo después de usado, para poder guardarlo en el mismo tubo.

4. ESPUTOS. Se recogen con la menor cantidad de saliva posible, en vasijas estériles o por lo menos muy



limpias, en las que se coloca un poco de agua esterilizada, pero sin desinfectantes.

5. HECES FECALES. Se recogen en vasijas limpias, pero sin desinfectantes. En el comercio se encuentran tubos especiales que llevan una cuchara de plomo sujeta en el tapón. La extracción puede hacerse directamente del ano en caso necesario, valiéndose de instrumentos apropiados. Cuando convenga separar de las deyecciones los copos mucosos, se deslíen aquéllas en una cápsula con agua estéril (casos de cólera, disentería).

6. ORINA. Se limpia previamente la uretra y se tira la primera porción de orina, recogiendo el resto en matraces estériles. También puede recogerse la orina mediante una sonda estéril. En caso necesario la orina se centrifuga antes de analizarla.

7. EXSUDADOS Y TRANSUDADOS. La toma se hace por punción mediante una jeringuilla o un trocar estériles, después de haber desinfectado la piel; el líquido cerebroespinal se extrae por punción lumbar. En caso necesario, centrifúguese antes de usarlo.—Para lo referente a los medios de cultivo más apropiados, véase pág. 25 y 142 n.º 1.



VIII

Inoculaciones y autopsia

Inoculaciones

Si el punto escogido para la inoculación está cubierto con pelos o plumas, deben quitarse afeitándolos o cortándolos. Los pelos pueden quitarse, también humedeciendo la piel con sulfhidrato cálcico (preparado saturando de sulfhídrico una lechada de cal) y quitándolo a los pocos minutos con algodón. La piel se jabona bien y se lava luego con alcohol sublimado, y finalmente con agua estéril.

1. *Inoculación cutánea.* Se efectúa arañando ligeramente la piel en el punto escogido y tocando luego con la òse cargada con el material inoculable. O bien, se afeita la piel y se frota después con papel de lija, frotándola luego enérgicamente con el material inoculable. También puede aplicarse la cánula de una jeringuilla por debajo de la epidermis, inyectando luego un poco de material.

Inoculación subcutánea

a) *En una bolsa hecha en la piel.* Se levanta mediante una pinza, un pliegue de piel, se hace un



pequeño corte con una tijera y con la punta de la misma o con una lanceta, estériles, se practica una pequeña bolsa en la dermis; dentro de esta última se coloca el material mediante una anilla de platino.

En las ratas y ratones la inyección se hace en la base del rabo. Para ello se sujeta el animal por la nuca, con una pinza curva y se coge el rabo con la mano. En los cobayas se les inocula generalmente en el vientre o en el pecho; a los conejos en la cara interna de la oreja, levantando una pequeña porción de la misma. A las aves se les inocula de preferencia en los músculos pectorales.

b) *Con la jeringuilla.* Para las inyecciones subcutáneas se utilizan jeringas de diversos tipos; entre las antiguas, las más usadas son las de *Pravaz* (de la que se han hecho modificaciones con el émbolo desmontable de asbesto) de *Koch*, *Stroschein*, *Loeffler* (con el émbolo de goma fácilmente reemplazable), siendo, sin embargo, la jeringa *record* con émbolo metálico, la de uso más extendido. Las jeringuillas deben esterilizarse antes y después de usarlas, en corriente de vapor o con alcohol-éter. No es necesario desinfectar previamente el lugar de la picadura. La inoculación se hace en los mismos sitios acabados de indicar en *a*) (a los conejos se les inocula en la piel del vientre).

3. *Inoculación intraperitoneal.* Para practicarla se coge un pliegue de la piel del vientre, se pica con la cánula y se introduce ésta, barrenando lentamente, en los músculos del abdomen. Debe utilizarse una cánula roma para no lesionar los intestinos. Para extraer el contenido del *peritoneo*, se practica una pequeña incisión en la piel del vientre, dejando al descubierto los músculos y se clava en éstos un capilar de vidrio estirado, penetrando en su interior un poco de líquido que luego se expulsa calentando ligeramente el capi-



lar o soplando por el extremo libre con una pera de goma o con la boca (teniendo cuidado de no tocar el capilar con los labios).

4. Las *inoculaciones intramuscular e intrapleural*, se practican de modo análogo al anterior.

5. Para practicar la *inoculación en la cámara anterior del ojo*, se cocainiza la córnea y se desprende por la parte superior, junto al borde escleral (como en la iridectomia) introduciendo luego el material inoculable. También puede utilizarse para ello la jeringuilla. — La *inoculación en la córnea cocainizada* (p. ej., con la vacuna) se hace por estría tangencial completamente lisa, cogiendo con una pinza un pliegue de la conjuntiva para mantener fijo el ojo.

6. *Inoculación en el torrente circulatorio*. Se pone al descubierto una vena cualquiera, fácilmente asequible (p. ej., la yugular externa) introduciendo en ella una cánula centripeta aguda, muy fina, y se practica la inyección muy lentamente. Debe tenerse mucho cuidado en no introducir aire, que daría lugar a una muerte por embolia.—En los conejos se inocula generalmente en una vena de la oreja, en especial la llamada vena marginal, que está junto al cartílago, en el borde externo de la oreja. Se provoca la hinchazón de la vena frotando con algodón empapado en alcohol o xilol y comprimiendo al mismo tiempo la base de la oreja. Si al practicar la inyección se hincha el tejido en el punto inyectado, esto prueba que la punta de la cánula no está dentro de la vena. — La *inoculación intracardial*, se practica introduciendo una cánula muy fina en el ventrículo y cuando empieza a salir sangre, se adapta el cuerpo de la jeringa lleno y se practica la inyección.

7. Las *inoculaciones en el estómago* se practican colocando entre los incisivos del animal una horquilla de madera y teniendo así abierta la boca, se intro-



duce hasta el estómago una cánula flexible de caucho, por la cual se inyecta el material en el estómago del animal. A los animales de gran tamaño se les pueden introducir dentro de la garganta, patatas vaciadas, dentro de las que se coloca la materia inoculable, obligándoles a deglutirlas (puede hacerse lo mismo con bolas de pan infectadas).

8. *Inoculación por medio de los alimentos.* Si el material que ha de ingerirse no es por sí mismo un alimento, se mezcla con uno de éstos (por ejemplo, pueden recubrirse pedazos de pan con cultivos bacterianos).

9. *Infección por las vías respiratorias.* Puede producirse por inhalación de los gérmenes pulverizados o proyectados por medio de aparatos especiales, o bien se inyectan los gérmenes directamente en la tráquea, introduciendo la cánula de la jeringa entre dos anillos traqueales.

Dosificación del material inoculable

Cuando se quiere inocular cantidades determinadas de material, se procede del modo siguiente:

1. Los *productos líquidos* (diluídos si es preciso en cantidades conocidas de caldo estéril o de sol. de ClNa al 0,85 %) se inyectan mediante una jeringa calibrada, hasta haber introducido el volumen que se desee.

2. *Materias inoculables no líquidas.* Para la toma de material se utiliza una ñse o anilla de platino hecha en el extremo de un hilo, sujetando el otro extremo en un mango a tornillo parecido a los lapiceros de bolsillo. El hilo de platino separado del mango, se clava en un corcho y se pesa en una balanza de precisión, se carga de material y se pesa en seguida de



nuevo; la diferencia entre las dos pesadas representa la cantidad de materia. Luego se lava la anilla con una cantidad suficiente de un líquido estéril, se toma una fracción determinada de éste (0,5 cc., por ejemplo) que contendrá una cantidad conocida de material (p. ej. 0,2 mgr.) y se inyecta. Utilizando la misma anilla para el mismo material y cargándola siempre de modo igual, se obtienen valores tan homogéneos que puede prescindirse de la pesada. Deben construirse öses llamadas normales, que cargadas completamente lleven unos 2 mgr. de un cultivo de 24 horas sobre agar, de b. diftérico o de vibrión del cólera; en Alemania se encuentran en el comercio varillas graduadas para preparar anillas idénticas en el tamaño.

Determinación del número de bacterias en el material inoculable. Se toma el material como ya se dijo, y se siembra una cantidad del mismo, idéntica a la que se inyectó en agar o gelatina, y se distribuye en placas. En caso necesario, se diluye previamente otra vez, en una cantidad determinada de caldo estéril y se siembra una parte alícuota de la dilución. Después de desarrolladas las colonias, se cuentan como las del agua (pág. 181). Del mismo modo se determina el número de bacterias de cualquier clase de material.

Rotulación y conservación de los animales de ensayo.

—Las ratas y ratones se colocan en vasos altos de vidrio (las conservas usadas para poner dulces, p. ej.) convenientemente rotulados y provistos de un cierre de tela metálica. Los cobayas se colocan en tiestos de barro, con tapadera de alambre, y se clasifican según su peso, sexo y color. (Se tienen clichés especiales con retratos de los animales para inscribir el color). A los conejos se les tiñen las orejas con diferentes colores de anilina, para distinguirlos, o bien se les clavan en las orejas unas chapitas metálicas numeradas, cosa también aplicable para distinguir los coba-



yas. Los animales infectados, se colocan en jaulas especiales, y a ser posible, aislados cada uno por sí.

Para *tomar la temperatura*, se les introduce en el ano un termómetro de máxima que tenga pequeño el depósito de mercurio. Las temperaturas normales, son: para los perros de 37,5° a 39,9° C., los conejos de 38,3 a 39,9°, los cobayas de 37,3 a 39,5° (la mayor parte unos 38°), las palomas de 41,0 a 42,5°, las gallinas de 41,0 a 42,5°.

La *inmunización de animales*, por medio de inyecciones a dosis progresivas, de toxinas bacterianas, de bacterias muertas o vivas, es variable según la especie bacteriana y según el fin que se persigue. En general, se procede de modo que la primera inyección subcutánea, intraperitoneal, etc., se efectúa con una cantidad de cultivo o de toxina, cuyos efectos son inferiores a la dosis letal mínima. Se observan exactamente las variaciones en el estado del animal, y la segunda inyección se efectúa con una cantidad algo mayor de cultivo o de toxina, en caso de que aquél esté restablecido completamente, y en especial, además, en caso de que haya aumentado de peso o por lo menos no haya perdido. Las inoculaciones siguientes, se practican de idéntica manera.—La *inmunización destinada a obtener suero apropiado para las suero-reacciones*, se hace inyectando cultivos de tifus, cólera, etc., muertos por calefacción a 60°, durante 1 hora. En los conejos, bastan generalmente ya 3-5 inyecciones, aplicadas intravenosamente, en períodos de 7 días y aumentando desde 1 a 10 öse de cultivo sobre agar muerto. A los 7 días de la última inyección, se efectúa la sangría en una vena de la oreja, en la yugular o en la carótida; se descubre la vena asépticamente, se hacen dos ligaduras flojas distantes, se abre el espacio intermedio por sección longitudinal y se aprietan las ligaduras cuando la sangría es sufi-



ciente (la sangre se recoge en vasijas estériles). La sangría puede hacerse también por picadura en el corazón (v. pág. 173 núm. 6). Con objeto de recoger la mayor cantidad posible de sangre, conviene cloroformizar el animal profundamente, abrirle rápidamente el tórax, quitar los pulmones y sajar el corazón; la sangre que fluye se toma en seguida con una pipeta ancha. En los animales mayores la sangría se hace sin practicar incisión en la piel, comprimiendo la yugular contra la columna vertebral e introduciendo la cánula de la jeringa o el trocar, a distancia de aquélla. Las sangrías en las aves se hacen del modo indicado en la pág. 104 núm. 8. La sangre se conserva en la nevera y al cabo de algún tiempo se desprenden los coágulos de las paredes de la vasija, mediante una aguja de platino, extrayendo el suero a las 24-48 horas con una pipeta estéril, centrifugándolo si es preciso, para obtenerlo totalmente exento de glóbulos rojos; en caso necesario puede añadirsele 0,5 % de fenol para conservarlo.

Autopsia

La autopsia ha de efectuarse tan pronto como sea posible después de muerto el animal. Cuando sea preciso aplazarla, se conservará el cadáver en un sitio fresco.

Antes de la autopsia conviene, a ser posible, no tocar el cadáver con las manos; durante la autopsia debe evitarse en absoluto (salvo si se trata de animales grandes) el tocarlo, utilizando siempre el instrumental apropiado, preparado ya de antemano. El cadáver se extiende sobre el dorso con las extremidades sujetas a los lados del tronco, mediante alfileres, clavos o con cabos de liza que se fijan sobre la tablilla



de disección. Luego se humedece bien la piel del pecho y del vientre con sol. de sublimado, empapándola bien para evitar que durante la disección se levanten pelos o plumas, o bien se humedece con solución de jabón cresolado, cuyo olor aleja las moscas; también puede emplearse xilol que mata los parásitos que pueda haber o puede afeitarse la piel después de jabonarla bien. A las aves se les despluma el pecho y el vientre, luego se lava la piel. Después de limpia la piel se practica una incisión por la línea media, desde el cuello hasta la sínfisis pubiana, mediante instrumentos estériles (v. pág. 9 y 10 núms. 1, 2 y 3) y seseparan las dos mitades hacia los lados, prolongando la incisión hasta la cara interna de los muslos. Al abrir el el animal obsérvense las glándulas linfáticas subcutáneas. Los músculos que quedan al descubierto se flamean para destruir los pelos que puedan haber caído encima. A continuación, se levanta un pliegue en los músculos abdominales por debajo del apéndice xifoídes, mediante instrumentos esterilizados recientemente, y se raja la pared abdominal hacia la línea media o mejor un poco hacia la derecha, se separa de las costillas y las dos mitades de masa muscular se separan a ambos lados, sujetándolas con alfileres sobre las dos capas de piel separadas al principio. La parte disecada a la izquierda del animal se deja un poco mayor, para conseguir de este modo que quede descansando sobre ella el bazo, órgano muy importante en la mayoría de las enfermedades infecciosas, protegiéndole de contaminaciones posibles. En las ratas y ratones los músculos del abdomen se desgarran con dos pinzas, en lugar de cortarlos. Después de revisados los órganos abdominales y de haber hecho los cultivos convenientes con ellos, se abre el tórax de abajo arriba, cortando las costillas con una tijera a los lados del esternón; se levanta luego el



apéndice xifoides y encima de él el esternón con los fragmentos de costillas que lleva adheridos, después de separarlo del diafragma, quedando de este modo al descubierto los órganos torácicos.

Los instrumentos deben flamearse cuidadosamente cada vez, o se cambian tan pronto como exista sospecha de que han tocado alguna parte contaminada. Los instrumentos *nunca deben dejarse en otro sitio que allí donde se utilizan; de lo contrario deben flamearse antes.*

Los órganos de los cuales quieran prepararse cultivos se sajan con un instrumento agudo esterilizado, introduciendo por la sección una anilla de platino en el interior del órgano y sembrando en seguida las partículas que queden adheridas a aquél. Si se sospecha que la superficie del órgano está contaminada, se desinfecta pasándole por encima una hoja de cuchillo muy caliente, y luego se opera del modo descrito. Cuando quieran sembrarse fragmentos grandes, se cortan con una tijera y se tocan con una anilla de platino caliente a la que se adhieren fácilmente. Los nódulos duros (p. ej., de los órganos tuberculosos) se separan con una tijera, se aplastan entre dos cubreobjetos estériles (v. pág. 9 núm. 1), entre dos escalpelos o con una pinza ancha de punta y los fragmentos que resultan, se distribuyen en el medio de cultivo y sobre cubreobjetos.

Si las siembras han de hacerse más tarde, se cortan asépticamente los fragmentos de órgano y se conservan separadamente en doubles cápsulas esterilizadas.

Los órganos que contienen siempre bacterias, como por ejemplo, el intestino, deberán abrirse al final, cuando se hayan hecho ya las siembras con los demás.

En todas las autopsias, debe observarse siempre el estado del punto inoculado.



Para hacer preparaciones microscópicas, se arrancan con la pinza pedacitos de tejido, se frota con ellos los cubreobjetos y luego se colorean los frotos (v. página 54 y siguientes).

Para la conservación de fragmentos de tejidos, destinados a la preparación de cortes v. pág. 58.

Una vez terminada la autopsia, se destruye el cadáver quemándolo en un horno o se envuelve en papel pergamino y se entierra, o bien se echa en un recipiente con ácido sulfúrico conc. Si es un animal grande, puede desinfectarse en corriente de vapor de 1 a 4 horas entregándolo luego al desollador; la mesa de disección se lava con sublimado al 1-2 por mil al que se añade 3 % de ClH. Los punzones, etc., se calientan al rojo.



IX

Análisis bacteriológico del agua, del aire y del suelo

Análisis del agua

Toma de las muestras de agua: La extraída por medio de bombas, se recoge en tubos de ensayo estériles (después de flamear la boca de los mismos), lo más cerca posible del origen y después de haber hecho funcionar largo rato la bomba. En los pozos abiertos, en las fuentes, corrientes de agua, etc., se recogen las muestras en tubos de ensayo sostenidos a ser posible con la mano, o sujetándolos mediante un bramante, pudiendo también utilizar aparatos especiales, destinados a recoger muestras de capas profundas (como p. ej., el *matraz de Esmarch*, que va provisto de un cierre de plomo, ajustado con aro de goma, que puede abrirse a la profundidad que se desee, tirando de una cuerda sujeta al mismo; también se utilizan los tubos *de Sclavo*, contruídos con tubos de ensayo cuyo cuello se estira a la lámpara, cerrándolos sdespués de enrarecido el aire interior. Estos tubos s umergen a la profundidad deseada y dejando caere un peso sujeto a un bramante, se rompe la punta, penetrando el agua en el interior).

Modo de conservar las muestras hasta el momento



del análisis: Si éste no puede efectuarse inmediatamente, las muestras deben conservarse rodeadas de hielo.

Modo de disponer las muestras que han de examinarse: Cuando interese únicamente conocer las especies bacterianas presentes en el agua, se toma una porción de ésta, acabada de agitar, entre una òse y un cc., según la riqueza bacteriana del agua y se mezcla con gelatina líquida, se hacen diluciones si es necesario y se distribuye en placas.

Para determinar el número de gérmenes de un agua, se procede del modo siguiente: Mediante una pipeta estéril, se pasa 0,5-1,0 cc. a una cápsula Petri, pequeña y vacía. (Con cada muestra deben hacerse siempre, por lo menos dos siembras, a concentraciones diferentes) y si el agua contiene muchos gérmenes (aguas de pozo, río, pantano) se diluye antes de sembrarla, en 10-100 veces su volumen de agua estéril, tomando 0,1-1 cc. de la dilución, que corresponderá a $\frac{1}{10}$ — $\frac{1}{100}$ del agua original. El agua diluida, se mezcla con 10 cc. de gelatina estéril, líquida y calentada en un tubo de ensayo, cuyo borde se flamea antes de verter aquélla. Imprimiendo a la cápsula un movimiento de vaivén, se mezcla bien el agua y la gelatina, dejando luego que se solidifique en posición horizontal y manteniéndola en la estufa a 20-22°, durante 48 horas. (La gelatina recomendada oficialmente para este fin, se prepara según la pág. 18 núm. 2). Para *contar el número de colonias*, se coloca la placa sobre una lámina de vidrio negro, que lleva grabadas una serie de líneas que dividen la superficie en cm. cuadrados y en $\frac{1}{9}$ de cm.² (es la placa del aparato de Wolffhügel); si las colonias son poco numerosas, se cuentan todas valiéndose de una lente y se calcula luego las que corresponderían a 1 cc. de agua. Si el número de colonias es considerable, se cuentan las



comprendidas en 10 cm.² por lo menos (si no se pueden contar en éstos, se cuentan las comprendidas en 20 $\frac{1}{9}$ de cm.²) y a partir del resultado obtenido se calcula el promedio de colonias correspondientes a 1 cm.² (o a $\frac{1}{9}$); multiplicando este último por la superficie total de la placa (que es igual a r^2 , expresando r en cm.) se obtiene el número total de colonias, que deberá referirse como antes a 1 cc. de agua. En lugar de contar los cuadrados, pueden contarse las colonias por sectores, empleando entonces una lámina que lleve grabados éstos, o bien se coloca la cápsula sobre papel de filtro, se marca el contorno con un lápiz y se divide el círculo obtenido en un número determinado de sectores iguales; se cuentan luego las colonias en unos cuantos sectores, se deduce el promedio y se calcula por éste, el número total que se refiere como siempre a 1 cc. de agua. Por este último método el resultado es más exacto, debido a que el fondo de las cápsulas Petri es siempre algo abombado. Si las colonias son numerosísimas, se cuentan al microscopio con poco aumento, calculando previamente el tamaño del campo de visión, por medio del micrómetro objetivo y utilizando luego la misma combinación de lentes y la misma longitud de tubo. El recuento debe hacerse en 10 campos de visión por lo menos, sacando el promedio y efectuando el cálculo final como antes.

Si las distintas siembras de la misma muestra dan resultados diferentes, debe aceptarse como bueno el número más elevado.

Cuando no se disponga de placas para las siembras, pueden hacerse éstas en tubos con gelatina líquida, que luego se solidifican en tubo rodado (véase pág. 33) contando las colonias a las 48 horas, por medio de aparatos especiales.

Si la mezcla del agua y la gelatina se hace en los



tubos, vertiéndola luego en las placas, conviene dejar también en la estufa, el tubo con el residuo de gelatina, contando las colonias que aparezcan en él.

Al dar el resultado del número de gérmenes existentes en una muestra de agua, debe *consignarse siempre*: el plazo después del cual se hizo el recuento (ya que existen algunos gérmenes que no se desarrollan hasta los 3-4 días dando colonias visibles sobre la gelatina), la temperatura a que se incubaron y la reacción de la gelatina (determinada con el tornasol) y en caso necesario, también, la composición de esta última. Debe usarse de preferencia la gelatina de la pág. 18 núm. 2, haciendo el recuento a las 48 horas y germinando a 20-22°; de este modo se obtendrán *resultados comparables*.

Cuando se trate de determinar un número escaso de gérmenes, en cantidades de agua considerables, puede seguirse el procedimiento de *Hesse* (Zeit. f. Hyg. t. 69, pág. 522; t. 70; pág. 311). Para ello se filtra por una bujía Berkefeld, una suspensión de tierra de infusorios, esterilizada por ebullición, consiguiendo de este modo que la bujía quede recubierta de una capa de aquélla. A continuación se filtra por la misma bujía una cantidad grande, conocida, del líquido analizado, con lo que las bacterias quedan retenidas en el manto de tierra de infusorios, que pueden separarse fácilmente con la tierra y un poco de agua, dando un golpe de bomba en sentido inverso. Resulta muy apropiado para la investigación de los b. tífico y coli (las siembras deben hacerse en medios de cultivo especiales, v. pág. 115 y siguientes) y para el vibrión del cólera (v. además en las págs. 121 y 129, lo referente a la investigación de b. tífico y del cólera en las aguas).

También pueden prepararse placas con cantidades grandes de agua, mezclándola con gelatina que con-



tenga 20-25 % y además una cantidad igual de peptona, extracto de carne y sal común, en proporción tal, que quede reducida a gelatina ordinaria al 10 % (*Bürger C. B. I. Or. 79*, pág. 462).

Cuando la cantidad de agua no es excesiva, pueden prepararse también las placas por el *procedimiento de la evaporación*, que consiste en colocar en una cápsula de Petri 1-10 cc. de agua, que se evaporan insuflando en su superficie aire caliente a 42°, exento de gérmenes, haciendo que la placa gire constantemente durante la operación (ésta se efectúa ventajosamente en el aparato *Faust-Heim*, o uno análogo). El agua se evapora en 15-60 min. Para la investigación del colibacilo, da buen resultado, empleando medios apropiados (*Marmann, C. B. I. Or. 50, Gins, V. M. V. 3*, núm. 6, pág. 53).

El reconocimiento de las bacterias en el agua, puede hacerse absorbiendo o filtrando ésta por *placas de yeso* (v. *Müller, A. K. G. A.*, t. 47, pág. 513).

La *prueba de Eijkman* para el *reconocimiento del b. coli.* (*C. B. I., Or. 37*, pág. 742) se funda en el hecho de que dicho bacilo, a diferencia de la mayor parte de los contenidos en el agua, se desarrolla aún a 46° C. Para efectuarla, se calientan en la estufa a 46°, hasta unos 100 cc. de agua a la que se añade $\frac{1}{6}$ - $\frac{1}{8}$ de su volumen de la sol. de glucosa-peptona, indicada en la pág. 22 y colocando la mezcla en matraces de fermentación (como los indicados en la pág. 47). La presencia del *b. coli.*, se denuncia por el enturbiamiento y la formación de gases; no obstante conviene confirmarlo por otros ensayos (v. pág. 121). Graduando la cantidad de agua sembrada, se llega á determinar el volumen mínimo en el que se encuentran aún *b. coli.*, o sea su título. — *Bulir, Arch f. Hyg. t. 62*, ha indicado un método análogo, en el que la reacción es al mismo tiempo colorimétrica.



Para el reconocimiento del b. coli., *Flügge*, recomienda una solución de 5 de lactosa, 2,5 de peptona en 100 de agua, a la que se añade 0,1 de azolitmina disuelta en 3 cc. de agua. Esta sol. se diluye en nueve veces su volumen del agua analizada, se divide en varias porciones y se cultiva a 37°. Si se produce enrojecimiento, puede existir b. coli.; debe comprobarse no obstante (v. pág. 121).

Análisis del aire

1. Para la investigación aproximada de las especies bacterianas contenidas en el aire, se exponen durante un tiempo más o menos largo, placas de agar o de la gelatina abiertas o bien fragmentos de patata preparados según el método I. p. 26. — v. además *Ficker*, *Arch. F. Hyg.* 69, p. 48.

2. Para recoger cuantitativamente los gérmenes de grandes cantidades de aire, se adopta el método de *Petri-Fiker* (*Zschr. F. Hyg.* t. 22, pág. 33). Mediante una bomba aspirante, unida a un contador, se hace pasar una determinada cantidad de aire, al través de dos pequeños filtros de arena o de vidrio moli5o, de 0,25-0,5 mm., que se encuentran en el interior de un mismo tubo de vidrio, separados entre sí por fragmentos de tela metálica y se han esterilizado previamente. La arena y tela se siembran en placas de gelatina o de agar. Si el filtro era muy compacto, la primera porción del mismo contendrá ya todos los gérmenes. En lugar de la arena, puede emplearse también azúcar en polvo, que se disuelve en la gelatina después de sembrado (sin embargo, es muy difícil de esterilizar).

3. El siguiente método (*Bujwid*) resulta muy sencillo: se hace pasar una corriente lenta de aire, al



través de tres tubos de ensayos, que contengan 2 cc. de agua estéril cada uno, y provistos de tapones de goma con tubos doblados, en la misma disposición que un frasco lavador y unidos unos a otros. El aire deja los gérmenes en el agua. Una vez terminado la absorción, se siembran cantidades conocidas de aquélla en gelatina que se dispone en placas (v. pág. 181).

Mediante una esponjita humedecida en caldo se recoge polvo del que se deposita procedente del aire. Se exprime aquélla en gelatina o agar líquidos, que se vierten luego en placas. Si se quiere investigar el b. tuberculoso, se exprime la esponja en caldo y se inyecta éste en el peritoneo de un cobaya.

Análisis del suelo

Se llena una cuchara de platino, cuya cabida se conoce, con la muestra de tierra que se ha de analizar, y se siembra ésta en placas o en tubos rodados. Hay en el suelo muchos bacilos anaerobios; en caso necesario se disponen cultivos especiales para éstos. O bien se agita fuertemente una cantidad determinada de tierra, con sol. de sal común y se siembra una porción conocida de esta solución, en gelatina, etc. (no es exactamente cuantitativa, pues aunque se agite fuertemente, no se separan todos los gérmenes contenidos en los granitos de tierra).

Para el análisis de las capas profundas del suelo se cava un hoyo, de cuyas paredes se raspan porciones de tierra, que se siembran, o se emplea el perforador de *Fränkel*. Este se introduce en el suelo en una dirección determinada, y dándole movimiento de rotación; cuando alcanza ya la profundidad deseada, se le dan vueltas en sentido contrario, con lo cual se



abre una pieza situada en la parte inferior y se llena de tierra una cámara que se encuentra al lado de la punta. Luego se extrae el aparato de la tierra, dándole vueltas en la primitiva dirección. Las siembras se hacen como ya se dijo.

Para investigar en las muestras de tierra la presencia de microorganismos infecciosos (tétanos, edema maligno, carbunco) se ensayan subcutáneamente sobre animales, bien sea el material directamente o sol. de CINa al 0,8 %, previamente agitada con aquél.



X

Métodos de conservación de preparaciones, cultivos y órganos animales

A. Preparaciones

Las gotas suspendidas pueden conservarse largo tiempo; no obstante, es posible que siga en ellas el desarrollo de microorganismos y la degeneración de los mismos. Si se quiere conservar una fase determinada del desarrollo, se levanta el cubreobjetos y se pone una gotita de formalina en la misma gota suspendida, o en el ángulo del cubreobjetos, o bien un indicio de solución de ácido ósmico al 2 %, y se coloca el cubre de nuevo en su sitio.

Conservación de preparaciones teñidas (v. páginas 57 y 62).

Los mohos y levaduras se guardan sin teñir, preferentemente en gelatina *glicerinada* (7 de glicerina, 6 agua, 1 gelatina, 1 de ácido fénico al 1 %; calentar el conjunto y filtrar). Se recubren los bordes con lacre o barniz.



B. Cultivos

Para la resiembra de cultivos y conservación del material bacteriano vivo, v. pág. 36 y siguientes.

Si se quieren guardar cultivos en un determinado estado de desarrollo característico (p. ej., los cultivos por picadura, en gelatina, de vibrión colérico, con las «burbujas de aire» típicas en la superficie) para ponerlos de manifiesto en las demostraciones, deben matarse primero aquéllos por los vapores de aldehído fórmico.

En los cultivos en tubos, se ponen algunas gotas de formalina en la parte inferior del tapón de guata y se coloca éste de nuevo en su sitio, recubriendo la boca del tubo con un capuchón de goma y dejándolo así por lo menos 24 horas. (Si es cultivo en gelatina y ésta está licuada, se deja hasta que la gelatina se haya cuajado de nuevo por la acción del formol).

Luego se procede de distintos modos, a saber:

1. Se puede guardar el tubo tal como está. Condición precisa: el capuchón de goma ha de cerrar herméticamente, de lo contrario, el cultivo se secaría poco a poco.
2. Se levanta el capuchón de goma y se empuja un poco el tapón de guata hacia el interior del tubo, se vierte encima de éste una capa delgada de parafina fundida y se deja solidificar esta última. Si aparece alguna grieta, se rellena con parafina.
3. Se quita el capuchón de goma y se coloca en la boca del tubo un cubreobjetos redondo que ajuste exactamente y se recubre, mediante un pincel, la boca



del tubo y el cubreobjetos con gelatina glicerizada (v. mas arriba), (en lugar de ácido fénico puede añadirse sublimado al 1 %) se deja secar y recubre luego con barniz o lacre.

4. Se calienta sobre la llama de un mechero Bunsen, una aleación metálica fácilmente fusible (metal de Rose, metal fusible) y se hacen caer gotas de una altura de $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ m. sobre una lámina de vidrio. La masa metálica discoidea y delgada que se obtiene, se coloca, después de separar el capuchón de goma, sobre la boca del tubo de cultivo y se comprimen fuertemente los bordes que sobresalen sobre las paredes del tubo, y luego se calientan sobre la llama del mechero Bunsen, dando vueltas al tubo lentamente hasta conseguir un cierre hermético.

5. Se separan el capuchón de goma y el tapón de guata y se funde el tubo al soplete, por debajo de la boca. Debe tenerse cuidado en no dañar al medio de cultivo, al calentar el vidrio.

N. B. Los tubos que contienen agua de condensación, se guardan siempre en posición inclinada; o bien, se vierte con cuidado el agua antes de tratarlos por la formalina.

Los *cultivos en placas* se pueden conservar de la siguiente manera:

1. Se ponen un par de gotas de formalina en la tapa y se deja actuar 24 horas. (A ser posible, se invierte la posición de la placa, para evitar que caigan gotas de formalina sobre el medio cultivo; si no, se pega con cera un pedazo de papel de filtro en la parte interna de la cubierta, y se humedece aquél con formalina.) Luego se quita esta última (en caso de que no se haya evaporado ya) y se cubre el borde de la placa con una faja de goma.

2. Se hacen cultivos en placas, cuyas piezas ajusten perfectamente una a otra, se hace el tratamiento



por la formalina como en el núm. 1, y si se cierra herméticamente con parafina el anillo de contacto de ambas piezas.

3. Se hacen los cultivos en matraces planos, análogos a tubos de ensayos aplastados, etc. y se procede como en los tubos (v. más arriba).

Los fragmentos de placas de agar o de gelatina pueden conservarse del modo siguiente:

1. Se tratan por el formaldehído, de modo análogo al antes citado. Se corta y separa la porción que desea conservarse, se pasa a un portaobjetos (eventualmente se deseca sobre ácido sulfúrico, hasta que quede reducido a una capa delgada), se cubre con glicerina y un cubreobjetos, y el borde de este último se recubre con laca-asfalto. El aspecto de las colonias se deforma algo. Sólo da buenos resultados con las placas de agar.

2. Se dispone la placa sobre una laminilla de vidrio, y una vez efectuado el desarrollo, se pone un desecador sobre SO_4H_2 , se tiñen como las preparaciones en seco y se conservan en bálsamo del Canadá (no son apropiados para observar las colonias mismas, sino para estudiar la distribución de las bacterias en las colonias).

C. Organos animales destinados a demostraciones

(Método de Kaiserling)

1. Se inmergen los órganos, hasta decoloración completa, en la solución siguiente: agua común 4000, formalina 800, acetato potásico 85, nitrato potásico, 45.



2. Se lavan con agua y se pasan luego a alcohol de 80 %, hasta que reaparezca el color natural, renovando el alcohol hasta que haya desaparecido la formalina.

3. Se conservan finalmente en la sol. siguiente: agua dest. 900, glicerina 300, acetato potásico, 200.

Los órganos deben quedar cubiertos totalmente de líquido; en caso necesario, se lastran con pesos colocados encima de un poco de algodón.



TABLA COMPARATIVA DEL GRUPO TIFUS-COLI-DISENTERIA

	TIFUS	PARATIFUS A	PARATIFUS B	BACT. COL.	BAC. FAECALIS ALCALIOENES	B. DISENTERIA KRUSE SHIGA	B. DISENTERIA FLEXNER	B. DISENTERIA TIPO Y
Movilidad.	Muy viva, 8-14 cirros peritricos.	Muy viva, cirros peritricos.	Viva, cirros peritricos.	Regular, 4-8 cirros peritricos.	Viva, 1-6 cirros polares.	Movimiento molecular intenso únicamente.	Movimiento mol. intenso únicamente.	Movimiento mol. intenso únicamente.
Gelatina.	Col. superf. de licadas, grises, luego amarillas, forma de pampano.	Col. superf. de licadas, grises, luego amarillas, redondas.	Col. superf. blanco-grisáceas, luego amarillas, redondas, mucosas.	Col. superf. grises, pronto pardo amarillentas aplandadas.	Col. superf. gris blanquecinas luego amarillas, redondas, mucosas.	Col. superf. finas grises luego amarillas, forma de pampano.	Col. finas grises, luego amarillas redondas.	Col. superf. redondas, finas, grises, luego amarillas.
Agar.	Col. finas transparentes.	Col. finas transparentes.	Col. blancas o amarillentas.	Col. opacas blanquecinas	Blanquecinas.	Finas, transparentes.	Finas, blanquecinas	Finas, transparentes.
Patata.	Apenas visible.	Apenas visible	Césped gris amarillento.	Césped gris parduzco.	Césped gris amarillento.	Césped apenas visible.	Césped apenas visible.	Césped, apenas visible.
Caldo y agua de peptona.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento intenso.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento.	Enturbiamiento.
Formación de indol.	No.	No.	No.	No	No.	No.	A los 3-5 días.	A veces al cabo de algunos días.
Leche.	No coagula.	No coagula.	No coagula, a las 1-3 semanas aclaramiento	Coagula	No coagula, a veces aclara.	No coagula.	No coagula	No coagula.

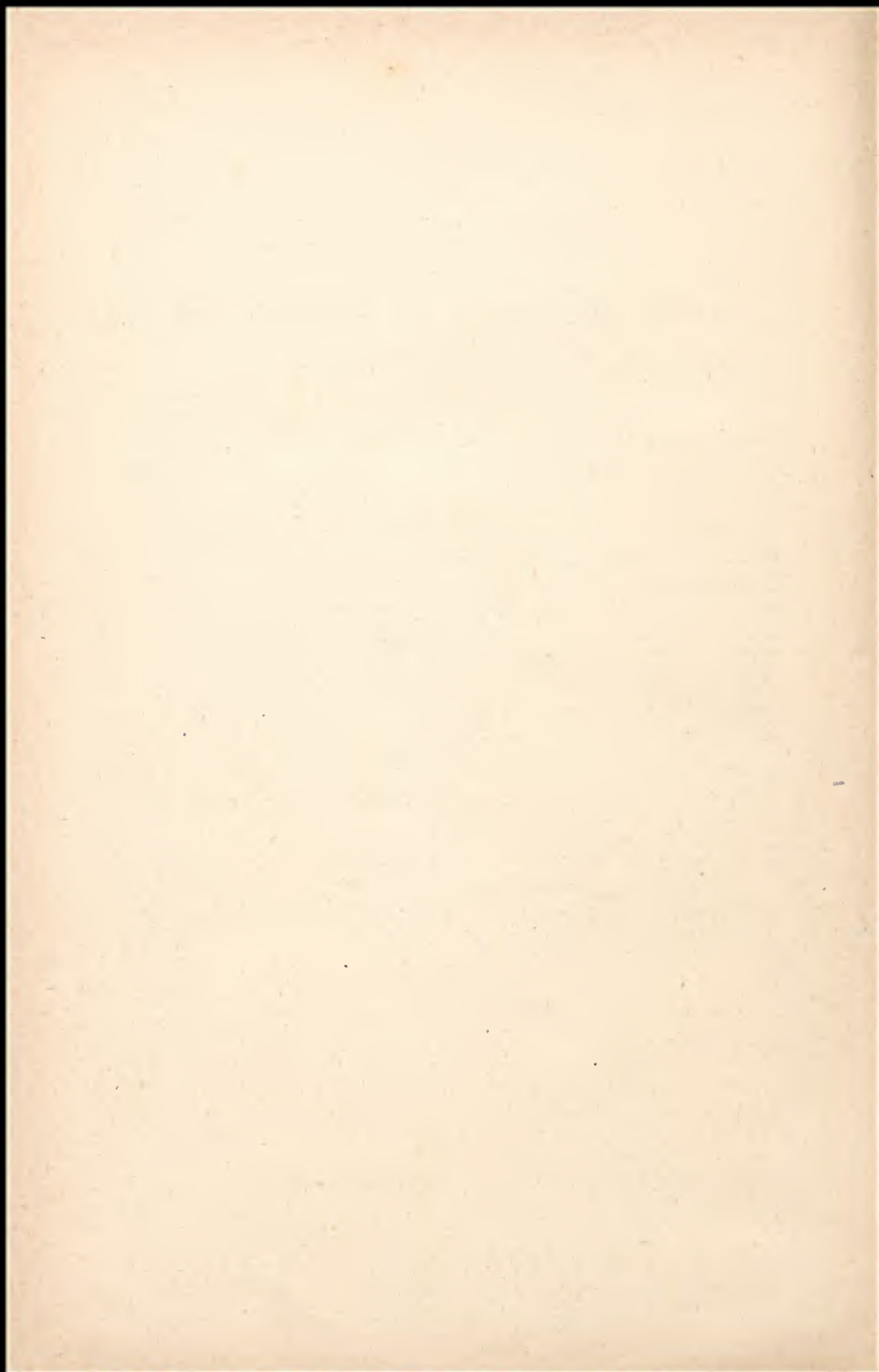
Suero de leche-tornasol.	Poco enturbiamiento, enrojece débilmente.	Enturbia poco, ligero enrojecimiento.	Enturbia y enrojece, a los pocos días aclara y azul.	Enturbia y enrojece mucho	Enturbiamiento ligero, azul.	No enturbia, enrojece débilmente.	No enturbia, enrojece débilmente.	No enturbia, enrojece débilmente.
Agar-rojo neutro.	No se altera.	Fluorescencia a formación de gases, ligera decoloración.	Fluorescencia a formación de gases, ligera decoloración	Fluorescencia, formación de gases, decoloración profunda.	No altera.	No altera.	No altera.	No altera.
Agar-glucosa-tornasol.	Col. finas transparentes azules.	Col. finas transparentes azules.	Col. azules húmedas.	Col. rojas opacas.	Col. azules, húmedas.	Col. finas transparentes azules.	Col. finas transparentes azules.	Col. finas transparentes, festoneadas, azul-violeta.
Agar Endo.	Col. finas incoloras.	Col. finas incoloras.	Col. incoloras.	Colonias gruesas rojas, con brillo metálico luego.	Incoloro.	Incoloro.	Incoloro.	Incoloro.
Agar-rojo Congo.	Col. finas transparentes rojas.	Col. finas rojas, transparentes.	Col. finas rojas	Colonias negras gruesas.	Col. rojas delicadas.	Colonias delicadas, rojas transparentes.	Col. delicadas transparentes rojas.	Col. delicadas transparentes, rojas.
Sol. de tornasol-nutroso-dextrosa.	Enrojece (generalmente) enturbia.	Enrojece, enturbia.	Enrojece, enturbia.	Enrojece. coagula, forma gases.	No altera o azul débilmente.	Enrojece, luego enturbia algo	Enrojece, luego enturbia a veces.	Enrojece, luego enturbia a veces.
Sol. de tornasol-nutroso-lactosa.	No altera.	No altera.	No altera.	Enrojece, coagula, forma gases.	No altera o azul débilmente.	No altera.	No altera.	No altera.
Agar-sacarosa-tornasol.	No altera.	No altera.	No altera.	Enrojece (no siempre).	No altera.	No altera.	No altera.	No altera.
Agar-manita-tornasol.	Enrojece.	Enrojece.	Enrojece.	Enrojece.	No altera.	No altera.	Enrojece.	Enrojece.
Agar-maltosa-tornasol.	Enrojece.	Enrojece.	Enrojece.	Enrojece.	No altera.	No altera.	Enrojece.	No altera.



ABREVIATURAS DE LA BIBLIOGRAFÍA

- Ann. Past —Annales de l'Institut Pasteur.
A. K. G. A. — Arbeiten aus dem Kaiserl. Gesundheitsamte
(Berlín).
Arch. f. Hyg.—Archiv. für Hygiene.
B. Kl. W.—Berliner klinische Wochenschrift.
C. B.—Centralblatt für Bakteriologie (I=I parte; Or.=tomo
original; Ref.=tomo de referatas.)
D. m. W.—Deutsche medizinische Wochenschrift.
Hyg. Rdsch —Hygienische Rundschau.
Klin. Jahrb.—Klinisches Jahrbuch.
M. Kl. M.—Medizinische Klinik.
M. m. W.—Münchener medizinische Wochenschrift.
V. G. M.—Veröffentlichungen aus dem Gebiete der Medizi-
nalverwaltung.
V. K. G. A.—Veröffentlichungen des Kaiserl. Gesundheits-
amtes.
Zeit. f. Hyg.—Zeitschrift für Hygiene und Infektionskran-
kheiten.
-





ÍNDICE ALFABÉTICO

	Pgs.		Pgs.
A			
Abbé, aparato de ilumina- ción, modo de colocarlo .	5	Aglutinación en los menin- gococos	140
Actinomices	143	Aglutinación en el muermo.	97
Agar, como medio de cul- tivo.	17	Agua de anilina (colorantes a base de)	65
Agar glicerinado.	21	Aguas (análisis de).	181
» recubierto de san- gre.	104 y 142	» » » en el ti- fus	121
Agar adicionado de san- gre	104, 130 y 142	Aguas (análisis de) en el có- lera.	127
Agar Dieudonné.	130	Aguas (análisis de) en la co- libacilosis	185
» suero de Tochtermann. 100		Aguas (análisis de) según Bulir-Eijkman, etc. 184 y 185	
» ventajas e inconve- nientes	34	Alcali (ensayo de la forma- ción de)	48
Agar-tornasol de Drigalsky Conradi	115	Acidos ensayo de la forma- ción	48
Agar en placas, su prepara- ción	34	Ambozeptor	157
Aglutinación en el tífus 111 y 118		Amibas	147
» en el cólera . 131		Anaerobios (cultivo de los). 41	
» en la disente- ria	125	» (medios de cul- tivo para los)	42
		Angina ulcerosa.	99

	Pgs.		Pgs.
Anilina (agua de)	65	Borax, azul de metileno con (Manson).	140
Anís (esencia de) para cortes.	60	Botkin (aparato de cultivo de).	46
Antiformina	91	Botriomicosis equina.	138
Antígeno	156	Botulismo (bac. del)	123
Anticuerpos	156	Bubónica (peste)	132
Arsénico reconocimiento	146	Bulir, reconocimiento del coli.	185
Ascítico líquido para medios de cultivo	26 y 140	Bunge, coloración de cirros.	78
Ascoli (reacción de)	84	Burri método de la tinta china	7 y 39
Assmann (coloración de).	70		
Aire (análisis del)	186		
Autopsia	177		
Azul de metileno	68 y 69		
Azul de metileno reducción.	49		
Azúcar su adición a los medios de cultivo	14		

B

Bacterias faecalis alcaligenes.	108 y 194	Cacao (inclusiones en manteca de)	61
Bact. enterit Gaertner.	87 y 194	Caldo como medio de cultivo.	14
» coli	122 y 194	Calefacción (resistencia de las bacterias para la)	51
» » en las aguas	185	Cápsulas (coloración de).	74
Barterias (filtros para).	11	Cápsulas Petri	33
» (tamaño de las)	58	» dobles	33
» determinación del número en las placas	182	Carbunco (b. del)	71
Bacterias, determinación del número en el material inyectable	175	Carne (agua de)	12
Bacterias determinación del número en el agua	181	» (extracto de) para los medios de cultivo	19
Barsiekow medios de cultivo.	107	Carne (bacterias de la intoxicación por la).	122
Bacteriolosis en el cuerpo animal	108	Carne (examen bacteriológico de la)	123
Bilis (medios de cultivo con)	114	Celoidina (inclusiones en).	59
Bolo blanco para comprobar el tifus	118	Celoidina, inclusiones rápidas.	62
		Chancro blando (b. del)	98
		Ciruelas pasas como medio de cultivo	144
		Cirros (coloración de).	76
		Claudius (coloración según).	73

C

	Pgs.		Pgs.
·Cólera de las gallinas . . .	133	Condensación (agua de). 18 y 24	
» (vibriones del). . .	126	Corpúsculos polares . . .	101
» » aislamien-		Corpúsculos de Negri. . .	104
to en el agua	129	Congo, rojo (medios de cul-	
·Coli. bact.	122	tivo a base de).	117
·Colonias (siembras de) . .	35	Cultivos.	31
·Coloración de preparacio-		» de anaerobios . . .	41
nes sobre cubreobjetos . .	54	» (resiembra de) . . .	36
·Coloración de cortes . . .	58	» por siembra frac-	
» según Loeffler . . .	69	cionada	37
» » R. Pfeiffer. . .	67	Cultivos en gota suspendida. .	41
·Coloración según Kühne-		Cultivos (preparación de) . .	36
Pregl	67	Cultivos en placas	31
·Coloración según Manson .	149	» por picadura y por	
» » Nicolle		estría	36
método del tanino . . .	68	Cultivos en el cuerpo ani-	
·Coloración según Nicolle		mal.	40
método de la tionina . .	68	Cultivos, modo de conser-	
·Coloración según Frosch . .	69	varlos.	37
·Coloración según Roma-		Cultivos puros, modo de	
nowsky-Giemsa	150	prepararlos.	36
·Coloración según Giemsa .	150	Cultivos de un solo germen. .	39
» » Gram	70	» su conservación . . .	190
·Coloración según Gram-		Conservación de cultivos . .	190
Günther	72	» de órganos.	192
·Coloración según Gram-		» de preparacio-	
Nicolle	72	nes	57 y 63
·Coloración según Weigert		Cubre objetos, tamaño . . .	1
método de la fibrina . .	73	» modo de lim-	
·Coloración según Claudius. .	73	piarlos	8
» » Unna-Pap-		Cubreobjetos, cultivos sobre	
penheim.	98	(v. además gota suspen-	
·Coloración con mezcla de		dida)	192
azul metileno-eosina . . .	69		
·Coloración de contraste para			
las bacterias	69		
·Coloración de cápsulas . .	74		
» de esporas.	75		
» de cirros	76		
·Complementos (formación			
de).	159		
·Condensador de espejo . .	5		

D

Desecación (resistencia para	
la)	51
Desinfección	9
» de cultivos. 12 y 16	

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Fosforescencia de los cultivos	51	Gram (coloración según). . .	70
Frotes, su preparación . .	54	» » modificada. . .	72
» (coloración de) . .	56	» » ensayo del	
» (fijación de). . . .	55	comportamiento y de las	
Friedländer (neumo bacilo de).	139	bacterias.	72
Fuchina (medios de cultivo con)	116	Gram coloración, bacterias que lo toman y no lo toman	72
Fucus-crispus (medios de cultivo con).	148	Gruber (suerorreacción de). .	118
		Günther (decoloración según)	72

G

Gallinas (cólera de las) . .	133
Gangrena (gaseosa b. de la). .	135
Gelatina (como medio de cultivo)	15
Gelatina de punto de fusión elevado	16
Gelatina para el análisis de aguas	19
Gelatina en placas	31
» con glucosa	41
» ventajas e inconvenientes	34
Giemsa (coloración según). .	151
Giemsa (coloración según) para cortes	151
Glicerina-gelatina para pegar	59
Glicerina-gelatina para conservar preparaciones . .	190
Glóbulos rojos para la hemolisis	159
Gonococos.	141
» (secreciones pobres en)	143
Gota suspendida.	3

H

Hemolisis	157
Hemolítico, sistema . . .	159
Hesse, medios de cultivo . .	86
» análisis de aguas . . .	184
Heyden (agar de).	86
Hidrocele (líquido de) como medio de cultivo.	25
Hidrocele para análisis . .	170
Heces (análisis de las). . .	170
Huevos como medio de cultivo.	26
Hongos	145

I

Iluminación del microscopio.	5
Iluminación (aparato de), de Abbé	5
Iodo (tintura de), diluida . .	89
Iodo-iodurada (solución de). .	70
Inactivación del suero. . .	159
Inclusiones de tejidos, etcétera (v. éstos).	

	Pgs.		Pgs.
N		Patatas (pulpa de)	27
Nasal (secreción) modo de		» saladas	28
recogerla.	169	» glicerinadas	85
Naso-faríngea, secreción. .	169	Parafina (inclusiones en). .	59
Negri (corpúsculos de) . . .	164	» » rápidas.	61
Neisser (coloración según) .	101	Paratífus (v. tif. pericillium	
Necrosis (b. de la)	137	brevicaule)	146
Neutralización de los medios		Penicillium brevicaule . .	149
de cultivo	20	Peppler (coloración de cirros	
Neutralización (v. además		según)	79
agar, gelatina, etc.).		Peptonización	34
Neutralización con fenolfta-		Peritoneo (inyección en el). .	172
leína como indicador . . .	20	» (toma de muestra	
Nicolle, solución de azul		en el)	172
de metileno-tanino	68	Peste de los cerdos.	133
Nicolle, solución de tionina.	68	Peste bubónica (b. de la). .	132
» » para el Gram.	72	Petri (cápsulas de)	33
Nitrosoindol (reacción del).	50	Pfeiffer (coloración con fu-	
Nocht, coloración según		china según)	67
(Giemsa).	150	Pfeiffer (suerorreacción	
Nutrosa (medios de cultivo		de).	108 y 109
con)	115 y 142	Pick-Jacobsohn (coloración	
		según).	68
O		Picrocarmin (solución de). .	74
Orina, modo de recogerla. .	170	Piemia, análisis de la sangre. .	138
Ose, normal	2 y 175	Piociáneo (b.).	184
Osmico, ácido	55 y 71	Pirogálico	44
		Picadura (cultivos por) . . .	36
P		Placenta (sangre de)	168
Paloma (sangre de) como		Placas de cultivo	31
medio de cultivo.	104	Plaut-Vincent (angina de) . .	99
Pappenheim, coloración. . .	98	Polares, corpúsculos	101
Pan como medio de cultivo. .	28	Polvo (análisis del).	187
Patatas como medio de cul-		Pus, modo de recogerlo . . .	170
tivo	26		
		R	
		Rabia canina	164
		Ragit, medios de cultivo. . .	19
		Ratas (septicemia de las). .	133



	Pgs.		Pgs.
Reacción de los medios de cultivo	48	Suerorreaccion en el tifus según Gruber	111
Reacción, comprobación empleando como indicador fenoltalefna.	20	Suerorreacción en el tifus según Widal	118
Reacción, variaciones debidas al desarrollo de las bacterias.	48	Suerorreacción para la disenteria	123
Recurrente, fiebre.	163	Suerorreacción para el cólera.	129
Reductor poder de las bacterias	49	Suerorreacción para los meningococos.	141
Reichert, condensador	7	Suerorreacción para la sífilis.	156
Romanowsky (coloración según)	150	Sublimado alcohol	148
Roseolas (examen de las)	114		

T

		Tarozzi, medio de cultivo	42
S		Temperatura medida en los animales.	176
Sangre, modo de recogerla	166	Tétanos (b. del)	134
» (suero de)	23	Tifus (b. del)	105
Sangre, análisis de (v. tifus, malaria, sífilis, etc.).		» » su aislamiento del agua	121
Sangre, medios de cultivo con sangre (v. éstos).		Tifus, diagnóstico	106 y 113
Sclavo (tubos de)	181	» » de Ficker.	121
Septicemia hemorrágica.	133	Tochtermann, medios de cultivo	100
» de las ratas	133	Tornasol (medios de cultivo con)	107, 115, 125 y 141
Sífilis (espiroqueta de la).	183	Tos ferina (b. de la)	105
» (diagnóstico de la).	156	Toxinas, su producción por las bacterias	53
Suero, inactivación.	159	Tubos rodados	33
» como medio de cultivo	23		
Suero de leche	48		
Suerorreacción (obtención del suero para la)	176		
Suerorreacción (obtención del suero humano)	166		
Suerorreacción, obtención del suero de animales	176		
Suerorreacción en el tifus según Pfeiffer	180		

U

Ultramicroscopio	6
Unna-Pappenheim (coloración según).	98

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
W		X	
Wassermann, reacción . .	156	Xerosis (b. de la).	100
Wigert (coloración de) . .	73		
Widal (suerorreacción se-		Z	
gún)	118	Zettnow, coloración de	
Widal, suerorreacción (pre-		cirros.	81
paración del suero para		Ziehl, solución	61
la)	119		



