



Dr. HUGO VACCARO

Profesor titular de Bacteriología e Inmunología
de la Facultad de Biología y Ciencias Médicas
(Universidad de Chile)



BACTERIOLOGIA e INMUNOLOGIA

Curso Práctico



1937

OTROS TRABAJOS PUBLICADOS POR EL AUTOR

"Complicaciones pulmonares en cirugía gástrica. Vacunación preventiva". — En colaboración con el Prof. FELIX DE AMESTI. Imprenta y Litografía Universo, 1928.

"Infection des Poules a *Bacillus pullorum* au Chili". — Comptes Rendus de la Soc. de Biol., 1932, t. 110, p. 629.

"Vacuna Blanc. Estudio bacteriológico e inmunológico de los vacunados". — En colaboración con el Dr. A. SANTELICES. Rev. Méd. de Chile. Año LXIII. N° 7. Julio de 1935.

"Bacteriología y Anatomía Patológica de 57 casos de apendicitis aguda". — En colaboración con los Dres. H. RODRIGUEZ y MANUEL TELLO. Arch. de la Soc. de Ciruj. de Hospital. Año V. Setiembre de 1935. N° 6, p. 252-269.

"Los fermentos lácticos en las supuraciones de orden quirúrgico". — En colaboración con los Dres. A. HORWITZ y O. ALARCON. Arch. de la Soc. de Ciruj. de Hospital. Año VI. Mayo de 1936. N° 2, p. 49-63.

"Consideraciones clínicas y bacteriológicas sobre la infección ovular". — En colaboración con los Dres. V. MANUEL AVILES y MERCEDES PEREZ M. Bol. de la Soc. Chil. de Obs. y Gin. Vol. I, Año 1936. N° 6, p. 237-273.

"Contribución al estudio de la transmisión transplacentaria de los microorganismos". — En colaboración con el Dr. J. MENEGHELLO. Bol. de la Soc. Chil. de Obs. y Gin. Vol. I, Año 1936. N° 6, p. 273-302.

"La fiebre ondulante en Chile. Contribución al diagnóstico bacteriológico". — En colaboración con el Dr. A. HORWITZ. Rev. Méd. de Chile. Año LXIV. N° 3. Marzo de 1936. p. 117-170.

"Herencia de la Tuberculosis. Transmisión transplacentaria del Báculo de Koch. Verificaciones experimentales". — En colaboración con el Dr. J. MENEGHELLO. Bol. de la Soc. Chil. de Obst. y Gin. Vol. I, Año 1936. N° 9, p. 397-443.

"Acción del plasma sanguíneo sobre el desarrollo de los corinobacterios". — En colaboración con el Dr. A. HONORATO. Rev. del Instit. Bact. de Chile. Vol. V. N° 3-4. Diciembre de 1936. p. 43-57.

"Contribución al estudio de la conservación del bacteriófago. Influencia del pH". — En colaboración con la Dra. MERCEDES PEREZ M. Rev. del Instit. Bact. de Chile. Vol. V. N° 3-4. Diciembre de 1936.

"La Guerra Bacteriológica". — Soc. Cient. de Chile. 2-XI-36. (En publicación).

"Estudio bacteriológico de un caso de Micstoma del pie". — En colaboración con el Dr. LUIS AGUILAR. Soc. de Ciruj. de Chile. 16-XII-1936. (En publicación).

BACTERIOLOGIA E INMUNOLOGIA

CURSO PRÁCTICO DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO APLICADO A LA CLÍNICA Y SU INTERPRETACIÓN

Dr. HUGO VACCARO

Profesor titular de Bacteriología e Inmunología
de la Facultad de Biología y Ciencias Médicas
(Universidad de Chile)

Técnicas generales de laboratorio.
Reacciones Serológicas. Factores
de defensa y de inmunidad. Vacu-
nas y Sueros. Principales agen-
tes patógenos y su identificación.

IMPRENTA Y LITOGRAFIA "LEBLANC"
MONJITAS 511 - SANTIAGO (CHILE)

1937

ES PROPIEDAD
Inscripción N° 5379.

PROLOGO

El Profesor Hugo Vaccaro me ha distinguido pidiéndome un prólogo para el presente libro, y yo, agradecido, acepto el encargo, porque el Profesor Vaccaro es una de las realidades docentes de nuestra Escuela Médica, porque es una de las más brillantes esperanzas de nuestra Facultad, y porque estoy convencido de que este libro no podría ser ni más conciso, ni más completo, ni mejor.

He leído cada uno de los capítulos de esta obra y cada uno de ellos me deja la misma impresión: su concisión impide quitar una sola palabra del texto sin tronchar la enseñanza encerrada en cada frase; su plenitud es manifiesta, pues no se siente la necesidad de ampliar los detalles técnicos, y su bondad, precisamente, está marcada porque su letra llega al borde de la lección teórica, todo lo necesario para provocar en el lector la inquietud por conocer la teoría.

Merece una advertencia mi afirmación de ser este libro completo, y es que, naturalmente, no figuran en él aquellas materias cuya objetivación todavía no ha sido alcanzada: viruela, enfermedades a inframicrobios, etc.

Y por lo que hace a su bondad, declaro que no conozco mejores libros de este tipo, en los que, a menudo, se olvida que su primera función es enseñar a los que se inician. Y no podía ser de otro modo, porque esta obra es el resultado de varios años de trabajo en el que también han tomado parte los Ayudantes de la Cátedra y hasta los mismos alumnos.

Llevo leídos ya varios trabajos del Profesor Vaccaro o de sus alumnos o de sus Ayudantes—en todo caso suyos—y puedo declarar que me han llamado siempre la atención por la severidad de su técnica y por la parquedad de sus juicios y conclusiones.

La enseñanza de la Bacteriología e Inmunología enriquece al estudiante con una nueva disciplina en el método experimental, método cuya aplicación conduce directamente al lema del médico que, a mi juicio, podría expresarse así: lógica en el razonamiento y en la acción.

Profesor ARMANDO LARRAGUIBEL,
Decano de la Facultad de Biología y Ciencias Médicas.

MIS AYUDANTES

por su efectiva colaboración a la
enseñanza de nuestra asignatura
por el entusiasmo desplegado en
la difusión de estas disciplinas
han comprometido mi gratitud

HUGO VACCARO.

Il est des sacrifices qu'il faut savoir faire; la clinique, dans le cas actuel, doit céder le pas à la bactériologie. Je sais bien que ce n'est pas sans quelque mélancolie qu'on abandonne des notions laborieusement acquises, mais, encore une fois on doit se rendre à l'évidence. Il suffit d'être au courant des travaux bactériologiques pour voir le nombre incalculable d'erreurs qui a dû être commis alors que le diagnostic des angines n'avait que la clinique pour critérium. C'est pour porter la conviction dans les esprits hésitants ou récalcitrants, qu'il me paraît utile de mettre en saillie les erreurs relevées par la bactériologie.

DIEULAFOY

PRIMERA PARTE

BACTERIOLOGIA GENERAL E IMMUNOLOGIA

PRIMERA PARTE

CAPITULO I

ESTERILIZACION

DEFINICIÓN. — *Operación capital en técnica bacteriológica que permite la destrucción o separación total de los microorganismos.*

El aire, la piel, las mucosas del hombre y de los animales, en una palabra, el medio ambiente, son receptáculos constantes de gérmenes. De ahí que para hacer el estudio de un microbio determinado o para hacer el diagnóstico etiológico de una enfermedad infecciosa sea indispensable preservar los productos destinados al análisis bacteriológico, recibiendo, sembrando, etc., en objetos absolutamente estériles. Tal es la importancia fundamental de la esterilización en bacteriología.

El valor de la esterilización en Medicina y Farmacia ha aumentado considerablemente a medida que se ha ido reconociendo con los años las ventajas de los medicamentos y materiales de vendajes y de curación esterilizados. Se está en absoluto acuerdo hoy día para reconocer que la mayor parte de los progresos realizados en Cirugía en los últimos tiempos son debidos a la aplicación de las doctrinas de Pasteur sobre la "asepsia" y la esterilización.

CLASIFICACIÓN.—Los procedimientos de esterilización pueden clasificarse en dos grandes grupos: *Físicos* y *Químicos*.

A.—PROCEDIMIENTOS FÍSICOS

Comprende: *la Filtración,*
la Ultrafiltración,
el Calor y
la Centrifugación.

Estudiaremos separadamente cada uno de ellos.

I.—Esterilización por filtración.

DEFINICIÓN. — *Método basado en fenómenos físico - químicos entre el cuerpo del microbio y una substancia porosa semipermeable y cuya finalidad es separar los gérmenes contenidos en los líquidos o en los gases.*

Los líquidos a filtrar deben atravesar, en un sentido o en otro, pequeños canalículos o sinuosidades sin número, de tal manera que los choques de los líquidos con los canalículos los desembarazarán de sus gérmenes y saldrán finalmente purificados; este hecho se verifica debido a la adsorción entre el germen y la pared del canalículo. Sin embargo, el fenómeno íntimo de la filtración, aun mal conocido, no sólo se debe a este fenómeno de adsorción, sino que también influyen otros factores igualmente físico - químicos, tales como: la viscosidad, acidez o alcalinidad del líquido, estado eléctrico, duración de la filtración, influencia de la presión y de la temperatura.

Así, por ejemplo, el "signo eléctrico" de las bujías desempeña un papel primordial en la filtración. Las bujías de Chamberland y Berkefeld poseen carga eléctrica negativa.

Kramer, quien construyó bujías con carga eléctrica positiva, comprobó que retenían los infra - microbios (bacteriófago, virus del mosaico) que tan fácilmente atraviesan los otros tipos de bujías. Esto es debido a que casi todos los infra - microbios tienen carga eléctrica negativa y son, por consiguiente, fácilmente "adsorbidos" por las bujías con carga eléctrica positiva.

No podemos considerar la filtración como un simple fenómeno de tamización, puesto que siempre el tamaño de los gérmenes retenidos es muy inferior al diámetro de los poros de las bujías.

La filtración se efectúa en aparatos llamados **filtros**, cuya parte esencial es el elemento poroso (bujías, discos, arena, etc.).

Los filtros de uso más corriente en los laboratorios son aquellos cuyo elemento poroso está constituido por bujías. La naturaleza de estas bujías semipermeables es variable:

Bujía Chamberland. — Tubo o bujía de porcelana porosa, de longitud y diámetro variables, abierto solamente en uno de sus extremos. El líquido que se va a filtrar atraviesa la bujía de fuera hacia adentro y sale por la extremidad abierta.

Las bujías de Chamberland para el uso bacteriológico, son numerosas: hay modelos de Laboratorio (L): L1, L1 bis, L2, L3, L5, L7, L9, L11, L13, correspondiendo los poros más estrechos a la numeración más alta.

La bujía L1 es la más porosa, solamente clarifica, pero deja pasar todos los microbios.

L1 bis y L2 retienen los microbios de mayor tamaño, y dejan pasar los más pequeños, como el de la perineumonía de los bovinos.

L3 detiene el bacilo diftérico y esporas del tétanos.

L5 (antigua Chamberland F), se emplea para las filtraciones ordinarias por aspiración, como por ejemplo, líquidos albuminosos (extractos orgánicos, sueros terapéuticos, ascitis), y en la separación de los gérmenes de sus toxinas solubles.

L7 (antigua Chamberland B) se utiliza en la filtración por presión; retiene micro - organismos tan pequeños como el de la perineumonía, fiebre aftosa, pero deja pasar el virus del cólera del perro.

L13 deja pasar el bacteriófago de d'Herelle.

Bujía Berkefeld. — Filtra con mayor rapidez que la Chamberland, porque los poros son más grandes. Es recomendable en la filtración de líquidos albuminosos, retiene los gérmenes a excepción de los inframicrobios.

Son de 3 tipos: Tipo V (grado más poroso: 8 a 12 micrones);

Tipo N (normal o grado intermedio: 5 a 7 micrones);

Tipo W (grado menos poroso: 3 a 4 micrones).

Habiendo observado Berkefeld que el agua que brotaba de las

capas de tierra de infusorios era absolutamente transparente, tuvo la idea de construir filtros con ese material.

En el comercio existen, además, otros modelos, como la **bujía de Garros**, los **filtros de Seitz**, etc.

PRUEBA Y REGENERACION DE LAS BUJIAS.—Durante las filtraciones sucesivas los gérmenes se van acumulando en los canaliculos de la bujía por el fenómeno de adsorción ya visto, hasta que llegan a obstruir el lumen de los canaliculos retardando enormemente la filtración. Se hace entonces necesario desembarazarlos de esos gérmenes por medio de la operación conocida con el nombre de "regeneración". Para esto se procede del modo siguiente: se hierve durante media hora; se seca a la estufa a 37 grados durante 24 horas; se calienta al rojo blanco en el horno de mufla durante una hora.

En seguida procedemos a la "prueba" de la bujía, introduciéndola en una probeta llena de agua y dejando el extremo abierto sin sumergir, por el cual se hace pasar aire a presión; en caso de fisuras o grietas se escapan burbujas de gas.

Montaje y esterilización de los filtros. — La bujía nueva o regenerada debe ser colocada para su uso en un aparato especial que constituye el filtro y que debe ser esterilizado en su totalidad al autoclave a 120° durante 20 minutos.

II.—Esterilización por ultrafiltración.

DEFINICIÓN. — *Es una operación que consiste en hacer pasar un líquido a través de una membrana tal, que las substancias al estado coloidal sean retenidas pasando solamente las que se encuentran al estado molecular (Duclaux).*

La teoría actual considera las membranas que se utilizan en la ultrafiltración como un haz de tubos capilares.

El rendimiento de los ultrafiltros de colodión está en relación directa con la presión ejercida a una temperatura constante y en relación inversa a la viscosidad del líquido a filtrar.

En la ultrafiltración influyen los mismos factores que en la filtración: viscosidad, acidez o alcalinidad, etc.

Todas las membranas que se han utilizado para la diálisis (colodión, gelatina, etc.), han sido empleadas para la ultrafiltración, pero la que hoy día se usa más es la de colodión. El colodión es una solución de nitrocelulosa en mezcla con alcohol y éter sulfúrico en cantidades variables según el grado de finura que se le quiera dar a los poros.

En bacteriología se usan los ultrafiltros anteriormente descritos y son muy útiles en el estudio de los inframicrobios y de las formas filtrantes de los microbios.

III.—Esterilización por el calor.

a) *Esterilización por el calor seco. (Carbonización).*

Por la llama. — Se utiliza especialmente para esterilizar el asa de platino, que se lleva al rojo blanco (1300 grados), pipetas, varillas de vidrio, boca de tubos o matraces, etc. Se emplea para esto la llama del mechero de Bunsen o de un mechero a alcohol.

Por el aire caliente. — Horno Pasteur. — Este aparato está fundado en el principio siguiente: *en el aire ambiente, un calentamiento de 170° a 180°, mantenido durante 30 minutos, basta para destruir con seguridad todos los gérmenes.*

El horno Pasteur se usa para esterilizar principalmente objetos de vidrio y porcelana mediante el aire caliente.

Descripción. — El aparato se compone: de un cilindro de hierro batido, de triple pared, la central de menor altura; esta disposición determina dos espacios concéntricos que comunican por arriba; de un cesto de tela metálica colocado en la cavidad del cilindro; de un mechero para gas y de una tapa con agujero para el termómetro.

Terminada la esterilización se observa que el papel y el algodón toman una coloración pardo clara que en la práctica sirve de control.

Hay que evitar la carbonización del papel y del algodón, pues produce una breca rica en substancias antisépticas cuya presencia impide el desarrollo de los gérmenes.

Los objetos dentro del cesto metálico no deben tocar las paredes ni el fondo del horno.

Cuando se va a encender el mechero debe tomarse la precaución de aplicar la llama antes de dar salida al gas, con el objeto de evitar una explosión. Una vez terminado el tiempo de esterilización se apaga el mechero, dejando enfriar bien el horno antes de abrirlo y sacar los objetos, pues el cambio brusco de temperatura provocaría la ruptura del material de vidrio.

Además del horno Pasteur existe otro aparato muy usado en cirugía para la esterilización del instrumental, llamado *esterilizador de Poupinel* y que está basado en los mismos principios del horno Pasteur.

b) *Esterilización por el calor húmedo. (Coagulación).*

Esterilización con vapor de agua a presión manteniendo la temperatura de 115 a 120° durante 20 minutos.

El aparato más usado es el **autoclave de Chamberland**.

Descripción. — Caldera cilíndrica de cobre a cuya abertura se adapta, por intermedio de un anillo de caucho, una tapa de bronce que se mantiene sujeta por tornillos articulados provistos de su tuerca correspondiente. La tapa lleva una válvula de seguridad, una llave para dar salida al vapor y un manómetro indicador de la presión en atmósferas, así como de la temperatura en grados centígrados. En el interior, un cestillo de cobre, que está a 6 centímetros del fondo del cilindro donde existe cierta cantidad de agua. En la parte inferior una o dos coronas de mecheros Bunsen.

En los casos en que las sustancias o productos no puedan soportar temperaturas tan altas, se recurre a otros procedimientos:

1) **Tyndalización**, que consiste en el calentamiento discontinuo mediante el vapor de agua a 100° C. durante uno o dos minutos, operación que se repite tres veces con intervalos de 24 horas.

2) **Pasteurización**. Método basado en el calentamiento prolongado mediante una temperatura inferior a 100°, (55°, 70°, etc.). La pasteurización se usa para la destrucción de los fermentos y de la mayoría de los microbios patógenos no esporulados. Muy conocida también es la leche pasteurizada, los vinos pasteurizados, etc. En la práctica bacteriológica es preciso combinar la pasteurización con el calentamiento discontinuo de Tyndall.

Condiciones del material que se va a esterilizar. — Debe estar rigurosamente limpio. Las vasijas de boca angosta como tubos, matraces, pipetas, etc., deben taponarse medianamente apretados con algodón Cardet (sin desgrasar, es decir, no hidrófilo). Las de boca ancha (copas, placas de Petri, etc.), se envuelven con papel filtro o papel corriente no engomado.

Los objetos que se han de esterilizar mediante el calor seco deben estar completamente secos, de lo contrario se quiebran.

Control de la temperatura. — Se puede verificar la temperatura real que ha alcanzado el interior del autoclave mediante un termómetro de máxima o con "indicadores de temperatura":

Safranina	0,40 grs. y	mezcla rosada que se pone vinosa a 110°.
benzofaftol	100 grs.....	
Verde brillante	1 gr. y	mezcla azulada que se pone verde oscura a 115°.
acetanilido	100 grs.....	
Violeta de metilo	1 gr. y	mezcla blanca violácea que se pone azul violeta a 117°.
Terpina	100 grs.....	

Las mezclas se introducen en ampollitas cerradas y se colocan en el interior del autoclave.

IV.—Esterilización por centrifugación

Como ofrece menos seguridad, se emplea escasamente.

B.—PROCEDIMIENTOS QUÍMICOS

El estudio del poder bactericida de ciertas sustancias químicas ha dado origen a los desinfectantes y antisépticos, que se usan en la práctica médica; no ofrecen la seguridad de los procedimientos de la esterilización de laboratorio.

La desinfección tiene por objeto la destrucción completa y definitiva de los gérmenes patógenos y de sus esporas que se encuentran fuera del organismo vivo.

La antiseptia tiende, ante todo, a beneficiar los organismos vivos y cumple su finalidad con sólo retardar el desarrollo de los gérmenes e impedir su proliferación.

Se diferencian, por consiguiente, la antiseptia y la desinfección en la intensidad de sus efectos y en los objetos sobre los cuales actúan. Pero, como acabamos de verlo, esas diferencias no son fundamentales y de ahí que en la práctica diaria ambos términos suelen usarse como sinónimos.

Se utilizan como desinfectantes o antisépticos, soluciones de sublimado al milésimo; oxicianuro de Hg. al cuarto por mil; formol al 1%; yodó; cloroformo, alcohol, etc., etc.

Actualmente la antiseptia ha sido abandonada por la mayoría de los cirujanos y reemplazada por la **asepsia**, que se logra mediante la esterilización de los guantes, instrumental, paños, etc. Hay que tener presente que la asepsia es el resultado de la esterilización y no un procedimiento de esterilización.

CAPITULO II

MEDIOS DE CULTIVO

DEFINICIÓN. — Son preparados estériles que contienen las substancias nutritivas necesarias para el desarrollo de los microorganismos.

I.—CONDICIONES QUE DEBE LLENAR UN MEDIO DE CULTIVO

a) Contener las substancias nutritivas necesarias para el desarrollo del germen que se haya de sembrar. Generalmente se emplea materiales complejos obtenidos por maceraciones, infusiones o caldos de tejidos animales o vegetales, pero también se pueden emplear disoluciones salinas adicionadas de un compuesto hidrocarbonado.

b) Tener un pH conveniente. — En general la reacción que exige el desarrollo microbiano es neutra o ligeramente alcalina: pH 7 o pH 7, 4.

Como ordinariamente los medios empleados son fuertemente ácidos, para ajustarlos al óptimo necesario se emplea los siguientes métodos:

1.—Por el papel tornasol. — Es el menos preciso. Se procede por tanteos, agregando al caldo, con precaución, soda normal hasta que no vire ni el papel azul ni el papel rojo de tornasol. En este momento se añade una pequeña cantidad de soda para obtener una reacción ligeramente alcalina.

2.—Por la fenoltaleína. — En principio, el método anterior usando la fenoltaleína como indicador. No es aplicable sino en frío.

3.—Por los métodos de determinación del pH. — Es el procedimiento más exacto, porque mide la "reacción real" de los medios. Prácticamente se utiliza sólo el método colorimétrico:

A una pequeña cantidad de caldo, medida exactamente, se agrega un indicador apropiado (fenolsulfotaleína: pH 6,8—pH 8). Se coloca en un tubo

especial entre los dos etalones correspondientes que marquen un pH inmediatamente inferior e inmediatamente superior al pH a que se desea llevar el medio. Se agrega en seguida la soda hasta obtener una coloración intermedia a la de los dos etalones. Se anota la cantidad de soda gastada y según eso se deduce la cantidad que se debe agregar a la totalidad del caldo.

c) Estar previamente esterilizado.

d) Estar protegido de contaminaciones por los gérmenes exteriores (algodón Cardet).

II.—PREPARACIÓN Y COMPOSICIÓN

En general comprende cinco tiempos fundamentales:

a) Extracción de los materiales nutritivos de los tejidos animales o vegetales que los contienen;

b) Adición de las substancias de sostén (medios sólidos) o de nuevos materiales nutritivos;

c) Ajustarlo al pH óptimo;

d) Repartición;

e) Esterilización.

III.—CLASIFICACIÓN

Desde un punto de vista práctico podemos distinguir tres clases de medios nutritivos:

1.—Medios corrientes, apropiados para la gran mayoría de los microorganismos: caldo ordinario, agar - agar, etc.

2.—Medios especiales o mejorados que se emplean para el cultivo de determinadas especies microbianas, cuyo desarrollo es escaso o nulo en los medios corrientes.

3.—Medios diferenciales, que se emplean para la identificación o diagnóstico de los microbios. Están constituidos por los mismos materiales nutritivos de los medios ya nombrados, pero llevan además ciertas substancias o dispositivos que permiten revelar determinadas propiedades bioquímicas inherentes a algunas especies microbianas: producción de gases, de ácidos, acción proteolítica, etc. Así el B. coli se diferencia del B. tífico, porque el primero fermenta la lactosa, propiedad que se pone de manifiesto por el color rojo que aparece en los medios lactosados - tornasolados donde se desarrolla dicho germen.

Atendiendo a su estado físico, los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos:

- A.—Medios líquidos {
1. De procedencia animal
2. De procedencia vegetal
3. Sintéticos
- B.—Medios sólidos {
1. A base de agar - agar
2. A base de albúminas animales
3. De procedencia vegetal

A.—MEDIOS LÍQUIDOS

1.—De procedencia animal:

Son muy variados. Pero la mayoría de ellos se preparan tomando como base el **caldo corriente u ordinario**.

- a) Tomar 500 grs. de carne de buey. Picarla a máquina reduciéndola a pulpa. Macerar durante seis a doce horas en 1000 c.c. de agua.
b) Calentar a fuego lento agitando constantemente. Hervir después lentamente durante 10 minutos.
c) Tamizar por un trozo de tela tupido, exprimiendo el residuo. Filtrar en caliente el líquido que resulta por papel de filtro grueso (Chardin) previamente humedecido con agua fría para retener la grasa.
d) Agregar al filtrado:
Peptona seca 10 grs.
Cloruro de sodio 5 grs.
Hervir agitando constantemente hasta que se haya disuelto la peptona.
e) Ajustar el pH óptimo por los métodos ya indicados.
f) Colocar el matraz y precipitar en el autoclave a la temperatura de 115° durante 5 minutos. Se enturbia debido a la precipitación de los fosfatos térreos. Filtrar en caliente sobre papel Chardin húmedo. El líquido debe ser transparente.
g) Repartir en tubos o vasijas apropiadas. Tapar con algodón no hidrófilo.
h) Esterilizar al auto-clave a 110 - 115° durante 20 minutos.

Por adición al medio así preparado de diferentes substancias se obtienen otras tantas variedades de caldos.

Así el **Caldo - suero, Caldo - ascitis, Caldo - timo, Caldo - glucosado, Caldo - glicerinado, etc.**, se obtienen añadiendo al caldo ordinario las substancias correspondientes.

Caldo Martin. — Se obtiene por adición al caldo ordinario de una maceración de estómagos de cerdos.

PREPARACION DEL CALDO MARTIN:

- Hasta el tiempo c) inclusive, como el caldo ordinario.
d) Agregar 5 gramos de cloruro de sodio.
e) Mezclar el líquido obtenido con partes iguales de caldo de estómago de cerdo, que se prepara como sigue:
I.—Píquense más o menos cinco estómagos de cerdo, previamente lavados y bien limpios.
II.—Mezclar:
Pulpa de estómago 200 grs.
HCl puro 10 „
Agua a 50° 1000 „
Consérvese esta mezcla a 50° durante 24 horas.
III.—Calientese a 100° C. para destruir el exceso de pepsina y cuélese por tamiz.
IV.—Alcalinícese con soda normal.
f) Calentar la mezcla de los dos líquidos a 70° para destruir los albuminoides.
g) Ajustar a pH conveniente y seguir como en el caldo ordinario, (tiempos f), g) y h).

Agua peptonada. — Solución de peptona al 10% más cloruro de sodio al 5%.

Leche. — Leche fresca ligeramente alcalinizada y esterilizada.

Suero. — Poco empleado al estado líquido.

Sangre. — Se emplea desfibrinada o citratada (3 o/oo) para evitar la coagulación.

2.—De procedencia vegetal:

Agua de malta, Caldo de levadura, Maceración de papas o de zanahorias, etc.

3.—Medios sintéticos:

De muy reducidas aplicaciones prácticas.

Se emplean de preferencia en el estudio de algunos procesos bio-químicos de los microbios. Podemos citar: **Líquido de Raulin, Líquido de Pasteur, Líquido de Naegeli, Líquido de Kohn, Medio**

de Sauton, cuyas fórmulas se describirán en los capítulos correspondientes.

B.—MEDIOS SÓLIDOS

En general se componen de las mismas sustancias nutritivas que los medios líquidos, pero llevan además una sustancia indiferente, de escaso o nulo valor nutritivo, que sirve a las primeras de esqueleto o sostén.

En la práctica la más empleada de estas sustancias es el **agar - agar** o **gelosa**.

La **gelatina** se usa casi exclusivamente como medio diferencial, para investigar la acción proteolítica de algunas especies microbianas.

1.—Medios sólidos a base de agar - agar:

El agar - agar procede de ciertos géneros de algas de la India y se vende en el comercio en forma de fibras laminares secas. Tiene la propiedad de formar, por ebullición en agua, jaleas resistentes que no se licúan sino a temperaturas próximas a 60°. Como los medios preparados con agar - agar resultan opacos, deben clarificarse por agregación de albúminas. En la práctica se habla indiferentemente de "agar - agar" o "gelosa".

AGAR ORDINARIO:

- 1.—Preparar un caldo de carne de buey, como ya se ha indicado hasta el tiempo d) inclusive.
- 2.—Añadir 20 grs. de agar - agar (2%) previamente cortado en pequeños trozos, remojado en agua fría durante una o dos horas y exprimido en un lienzo después.
- 3.—Hervir la mezcla a 100° y mantener a esta temperatura agitando constantemente hasta la total disolución de la gelosa (alrededor de 30 minutos).
- 4.—Comprobar la reacción y reajustarla si se ha modificado.
- 5.—Enfriar hasta 55 a 60° y añadir una clara de huevo batida en 100 grs. de agua.
- 6.—Llevar al autoclave a 120° durante 1 hora. La albúmina se coagula y aprisiona las impurezas que enturbian el medio.
- 7.—Filtrar en caliente antes que el agar solidifique.
- 8.—Repartir rápidamente, también en caliente, mediante embudo de repartición.
- 9.—Esterilizar al autoclave a 115° durante 20 minutos.

2.—Medios sólidos a base de albúminas animales:

Suero coagulado. — Se emplea de preferencia el suero de buey o de caballo coagulado por el calor.

Debe ser transparente. Para que el suero conserve esta propiedad, la coagulación se practica en tubos inclinados a temperaturas que no excedan de 68° a 70°.

No puede esterilizarse por los métodos corrientes. Por lo tanto: 1) Debe aprovecharse su esterilidad natural, recogiendo la sangre por procedimientos especiales y por prácticos adiestrados para evitar así su contaminación. 2) Esterilizar por pasteurización combinada con la tindalización, o por filtración por bujía.

Gelatina. — Es un medio sólido a la temperatura ordinaria, pues se licúa a 23° a 24°.

Se le utiliza más bien como medio diferencial para reconocer los gérmenes que tienen acción proteolítica.

Líquido pleural. Líquido ascítico. — Generalmente se emplean como componentes fundamentales de algunos medios especiales: agar - ascitis, caldo - ascitis, etc.

Huevo. — Empleado de preferencia como medio especial en el cultivo de algunas especies microbianas: **Medio de Pétrof**, para el B. de Koch; **Medio de Dorset**, etc. Puede usarse al estado puro coagulado por el calor, pero generalmente se mezcla con otras sustancias.

3.—Medios sólidos de procedencia vegetal:

Papa. — Se emplea cortada en trozos, previamente pelados y lavados, de forma semi-cilíndrica, incluidos en tubos especiales (tubos de Roux) que se esterilizan a 120° durante 20 minutos. El tubo tiene en su extremidad inferior un estrangulamiento que separa el trozo de papa del agua de condensación que sirve para mantener húmeda la atmósfera interior.

Zanahoria. — De muy reducidas aplicaciones. Se prepara como la papa.

Los medios de cultivo para anaerobios son, en realidad, "medios mejorados" (extractos hepático y globulares; glucosa, etc.), y que deben estar privados de oxígeno libre o en disolución mediante variados procedimientos (regeneración, vacío, adición de sustancias reductoras, etc.).

Los medios líquidos se cubren de una substancia aisladora, (vaselina líquida, aceite, etc.), para evitar la penetración del aire. (Ver Capítulo XXX: Anaerobios).

CAPITULO III

SIEMBRAS, AISLAMIENTOS Y ESTUFAS

SIEMBRAS O CULTIVOS

DEFINICIÓN. — *Es uno de los medios de investigación bacteriológica. "Sembrar" un germen es depositarlo asépticamente en un medio de cultivo.*

Toda siembra debe adaptarse a los siguientes principios:

- 1.—*Practicarse en medios de cultivo favorables y con instrumentos asépticos.*
- 2.—*No contaminar ni destruir la semilla.*
- 3.—*Depositarla asépticamente en los medios de cultivo escogidos.*
- 4.—*Esterilizar los instrumentos inmediatamente después de cada operación.*

Los medios de cultivo para la siembra se reparten en: tubos, matraces de formas diversas, placas de Petri, etc.

INSTRUMENTOS. — Para efectuar las siembras se utiliza:

- 1.—**El alambre de platino**, (de 3/10 a 1 milímetro de espesor) sujeto a un mango de vidrio o de metal. El hilo de platino termina recto o doblado (asa), o aplastado (espátula).
- 2.—**Pipeta de Pasteur**. Tubo de vidrio con una extremidad afilada y cerrada, y la otra taponada con un trocito de algodón Cardet.
- 3.—**Pipeta en bola**. Variedad de la anterior con una parte ensanchada por insuflación del vidrio calentado al rojo.

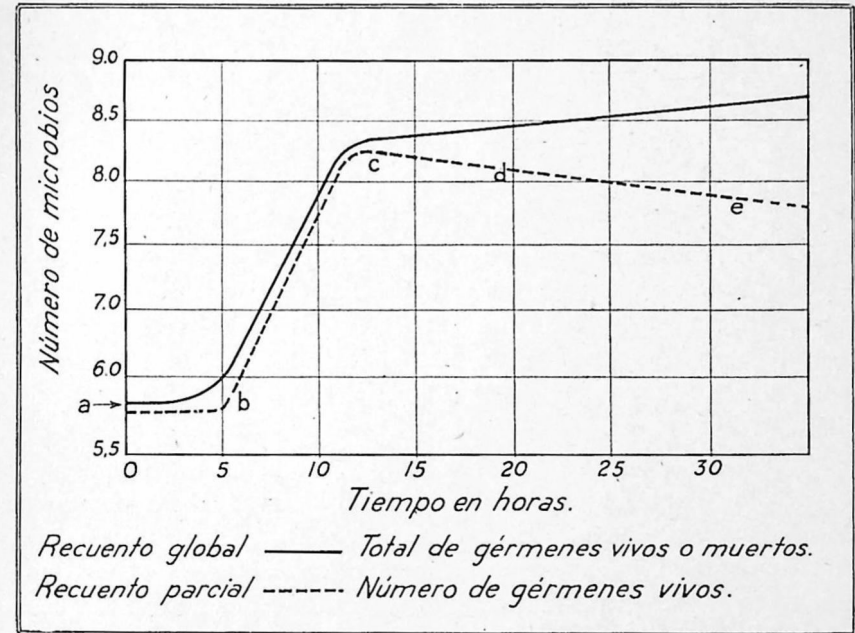
Siembra en tubos. — Puede hacerse de medio sólido a medio sólido (Asa de platino); de medio sólido a medio líquido y de medio líquido a medio líquido (pipeta Pasteur o asa) y de medio líquido a medio sólido (pipeta Pasteur o asa).

Siembra en medios sólidos.—Se usa el asa de platino. Tomar los tubos en la palma de la mano izquierda en posición casi horizontal. Sostener con los dedos. Con los tres primeros de la derecha tomar el asa de platino y esterilizarla en el mechero de Bunsen. Retirar el tapón del tubo que contiene la semilla utilizando el quinto dedo y la palma de la misma mano; esterilizar a la llama la boca del tubo; introducir el asa sin tocar las paredes del tubo; esterilizar la boca del tubo y taponar. Retirar en la misma forma el tapón del tubo que se va a sembrar. Introducir el asa cargada de semilla. Si se trata de una siembra en "picadura" (agar o gelatina vertical) llevar el hilo recto del platino a la superficie del medio y clavarla hasta el fondo del tubo. Retirar el hilo recto de platino y taponar. Esterilizar siempre a la llama el asa después de sembrar para evitar contaminaciones cuando se trabaja con gérmenes patógenos. Si se trata de una siembra en estría (agar, gelatina o papa) tomar la semilla con el asa, llevarla al fondo del tubo que se va a sembrar y retirarla rozando suavemente de abajo hasta arriba la superficie del medio haciendo varias estrias paralelas o una estría ondulada.

Siembra en medios líquidos.— Se usa la pipeta de Pasteur. Cortar el extremo cerrado; pasar por la llama; tomar la semilla introduciendo la pipeta al tubo que la contiene; aspirar; retirar la pipeta en posición horizontal taponando su parte alta con el índice para evitar su vaciamiento; taponar el tubo después de llamear; llevar la semilla al tubo que se va a sembrar introduciendo la pipeta y depositando una o varias gotas del líquido; retirar la pipeta. Llamear el tubo. Taponar. La pipeta usada se deposita siempre en un recipiente con solución desinfectante. Los tubos o recipientes sembrados deben marcarse inmediatamente con el nombre del germen o del producto patológico que se estudia; se anota la fecha y se llevan a la estufa a 37° o a la temperatura óptima de la especie microbiana, (B. de Koch a 38°, B. búlgaro a 42°, etc.).

El desarrollo microbiano comprende cuatro fases distintas:

1.—*Fase latente.* — (a - b). Inmediatamente después de la siembra los gérmenes no se multiplican, aun muchos mueren. La duración de esta fase depende de muchos factores: especie microbiana, medio de cultivo, cantidad sembrada, edad del cultivo, temperatura de incubación, etc.



2.—*Fase logarítmica.* — (b - c) En la que la multiplicación de los gérmenes alcanza su rapidez máxima. El aumento del número de microorganismos se hace en progresión geométrica, de tal manera que los logaritmos de sus números se trazan con el tiempo; ellos siguen una línea recta ascendente. Si el recuento se hace a intervalos es fácil calcular el número de generaciones durante este intervalo y la duración de cada generación.

Ejemplo.—Sea a = al número de gérmenes al comienzo de un tiempo dado.

b = al número de gérmenes al finalizar un tiempo dado.
 al final de la primera generación,

$$b = a \times 2$$

al final de la segunda generación,

$$b = a \times 2 \times 2$$

al final de n generaciones,

$$b = a \times (2n).$$

El tiempo de duración de la fase logarítmica depende también de la temperatura, del medio de cultivo, del germen sembrado, etc.

3.—*Fase estacionaria.* — (c - d) En la que cesa la multiplicación y el número de gérmenes se mantiene constante.

4.—*Fase de decrecimiento.* — (d - e) En esta fase empieza a disminuir el número de gérmenes vivos y termina con la muerte de todos los microbios. Durante un tiempo, variable según las especies, muchos gérmenes permanecen en estado de vida latente (*forma de resistencia*) aptos para multiplicarse cuando se siembran en un medio apropiado.

Observación de los cultivos. — Cada 24 horas se examinan las siembras y se anotan sus caracteres; enturbiamiento, velo, grumos, etc., en los medios líquidos; pureza de los cultivos, morfología de las colonias, pigmento, etc. en los medios sólidos; alteraciones de los medios diferenciales o especiales.

Conservación de los cultivos. — Las especies microbianas que se utilizan en trabajos de laboratorios conservan largo tiempo su vitalidad y su virulencia si se les mantiene en un medio apropiado, a la obscuridad, a baja temperatura (frigorífico) y en tubos capuchonados o lacrados para evitar la desecación. Los gérmenes que se desarrollan en medios corrientes (*B. coli*, *estafilococo*, etc.). Se conservan en agar picadura. Deben ser traspasados cada 30 ó 40 días. Otros gérmenes (*gonococo*, *bacilo de Pfeiffer*, *bacilo de Bordet*, *meningococo*, etc.), requieren para su conservación de medios especiales (agar - sangre, agar - ascitis) y temperatura constante de 37°. Deben ser traspasados cada 4 ó 6 días. Todavía existen procedimientos especiales de conservación para ciertos gérmenes: sangre del animal inoculado y desecada en tubos cerrados a la lámpara (utilizando la propiedad de vida latente en medios albuminosos de gérmenes como el *neumococo*, el *estreptococo*, etc.).

PREPARACION DE PASTA IMPERMEABLE PARA CERRAR TUBOS DE CULTIVO A CONSERVAR:

Materiales: caoutchut picado	200 grs.
parafina sólida	125 grs.
talco	200 grs.

- 1.—Se funde el caoutchut con la parafina.
- 2.—Se agrega el talco y se mezcla.
- 3.—Se aplica la pasta en caliente sobre el tapón de algodón recortado y flameado. A temperatura ordinaria tiene consistencia pastosa.

AISLAMIENTO DE LOS MICROBIOS

Para estudiar una especie microbiana necesitamos tenerla en *cultivo puro*, es decir, libre de otros gérmenes. El aislamiento de los microbios puede hacerse por:

- 1.—*Medios mecánicos* { a) *dilución*,
 b) *diseminación*.
- 2.—*Medios biológicos* { a) *destrucción de otros gérmenes* (calor),
 b) *cultivos en medios especiales*,
 c) *inoculación experimental*.

MEDIOS MECÁNICOS:

a) *Dilución en medios líquidos.* (Lister). — Consiste en sembrar una gota de la emulsión microbiana en un primer tubo de caldo. Mezclar. Tomar una gota para el segundo tubo y así sucesivamente en 10, 12 o más tubos. Se supone que el último tubo debe contener sólo una especie microbiana. Método inseguro, poco usado.

b) *Diseminación o dilución en medio sólido.* — Puede hacerse:
1.—*En medios previamente licuados.* Sembrar a temperatura conveniente (52° a 54°). La dilución se hace como en los medios líquidos. Después de sembrar, enfriar los tubos en recipientes con agua fría (anaerobios) o vaciar en placas de Petri esterilizadas (aerobios). Se obtienen colonias aisladas, que se pueden retirar con pipeta Pasteur o con asa de platino.

2.—*En medios sólidos al estado de tal* (fríos). Es el método

más empleado en bacteriología para el aislamiento microbiano. Se hace en agar estría (3 tubos o más) o placas de Petri (2 o más):

A) *En tubos* supongamos una muestra de pus que contiene varias especies microbianas. Con el asa de platino esterilizada tomar una partícula de pus, sembrar el primer tubo de agar estría según los principios enunciados al explicar las siembras en general. Sin tomar más semilla se siembra el segundo y el tercer tubo. En el último se obtienen colonias aisladas.

B) *En placas de Petri*. Hacer una dilución del producto patológico o del cultivo que se estudia, colocar una gotita en el centro de una placa de Petri: distender con una pipeta Pasteur acodada y sin tomar más semilla sembrar en las otras placas. Marcar los tubos o placas. Colocar a la estufa a 37 grados. Observar a las 24 horas. Si la siembra fué bien hecha se habrán desarrollado en la última placa o tubo colonias aisladas de los diversos gérmenes en estudio.

MEDIOS BIOLÓGICOS:

a) *Destrucción por el calor de los gérmenes asociados*. — Se utiliza cuando se trata de aislar gérmenes esporulados de otros sin esporas. La spora resiste al calentamiento a 100 grados, mientras que los gérmenes sin esporas mueren a 60 ó 70 grados.

b) *Cultivo en medios especiales*. — Se funda en que hay medios de cultivo favorables para algunos microbios y que impiden o retardan el desarrollo de otros. Ejemplo: el suero coagulado es el medio de elección para el bacilo de la difteria, el que se desarrolla a las 8 ó 10 horas, mientras que es un medio poco apropiado para los gérmenes que lo acompañan, (estreptococos, diplococcus catarhalis, etc.).

c) *Aislamiento por inoculación experimental*. — Se utiliza en algunos casos especiales. Ejemplo: Inocular expectoración de un neumónico a una laucha blanca (vía intraperitoneal). El animal (reactivo biológico del neumococo), muere de septicemia a neumococo. Todos los otros microbios de la expectoración son fagocitados y destruidos. Para obtener el cultivo puro de neumococo se siembra en medios apropiados la sangre tomada del corazón de la laucha.

ESTUFAS DE CULTIVO

DEFINICIÓN. — Son aparatos especiales destinados a mantener los cultivos a una temperatura constante y conveniente al desarrollo de los gérmenes.

DESCRIPCIÓN. — La estufa es una caja de doble pared, una interna de metal pulimentado y otra externa cubierta de una substancia aisladora. Entre ambas paredes se deposita agua cuya altura es marcada por un nivel exterior. En la pared superior existe:

- 1) Un termómetro cuya extremidad inferior queda en el interior de la estufa;
- 2) Otro termómetro que marca la temperatura del agua, y
- 3) Dos o tres pequeñas aberturas que permiten la aireación del interior y evitan que el calentamiento se haga en forma desigual (exceso de calor en la parte alta).

En la parte inferior está el sistema de calefacción, (gas, electricidad, etc.). El regulador automático puede ser de mercurio, bimetálico, etc.; sirve para regular la cantidad de gas o energía eléctrica y mantener así una temperatura constante en el interior de la estufa. El interior está dividido en compartimentos por rejillas móviles. La estufa debe cerrar herméticamente; lleva una puerta externa de doble pared como la caja de la estufa y otra de vidrio doble (resistente), ambas ajustadas a los bordes de la caja por tiras de fieltro. La estufa descrita tiene capacidad relativamente escasa.

Para usos industriales y en los grandes laboratorios se requiere la

CÁMARA ESTUFA. — Su fundamento es el mismo, con las siguientes diferencias dependientes de su mayor capacidad: La cámara estufa es una pieza; no es transportable. También existe la doble pared entre las cuales hay una substancia aisladora sólida (aserrín, corcho, virutas, etc.). El sistema de calefacción se encuentra en el interior de la cámara y es indispensable que el aire caliente circule y se reparta uniformemente por todo el espacio de la cámara.

Envío de cultivos y de productos patológicos. — Para enviar cultivos o muestras de productos patológicos (pus, deposiciones, expectoración, etc.), se colocan los tubos en cajas de madera, resistentes, herméticamente cerradas, con una etiqueta que indique su contenido.

CAPITULO IV

TECNICA MICROSCOPICA Y ULTRA-MICROSCOPICA

La Bacteriología, como ciencia microbiológica que es, ha tenido que estar íntimamente ligada al descubrimiento y al perfeccionamiento de los métodos de visión y entre éstos en especial del microscopio, instrumento que pasa a ser así un elemento fundamental en esta rama de la Medicina.

TEORIA DEL MICROSCOPIO

El microscopio es un instrumento de óptica que permite ver y estudiar objetos que, por su pequeñez, son confusos o invisibles. La producción de imágenes amplificadas de objetos diminutos se logra con el empleo de lentes de cristal: éstas se consideran, por lo tanto, como las partes constitutivas esenciales de un microscopio. Los demás órganos del mismo desempeñan un papel accesorio en el fenómeno óptico de la ampliación de un cuerpo pequeño.

Es indispensable recordar algunos conceptos de óptica para comprender la teoría del microscopio. Se da el nombre de *lentes* a los medios transparentes limitados por dos superficies esféricas o una esférica y otra plana que producen la convergencia o la divergencia de los rayos luminosos. Las superficies esféricas pueden ser convexas (positivas) o cóncavas (negativas). Recibe el nombre de **lente convergente o cristal de aumento** cuando en ella predomina la superficie convexa; y la de **divergente o cristal de reducción** si la cara cóncava es la dominante. De esto se deduce que en el mi-

croscopio tienen aplicación exclusivamente las lentes convergentes, y a ellas nos referiremos. Estas propiedades de las lentes son debidas a los fenómenos de refracción de la luz, es decir, a la desviación que sufren los rayos luminosos cuando atraviesan medios de densidad diferente. Esta desviación puede ser resumida en el principio de óptica que sigue: Un rayo luminoso que pasa de un medio menos denso a uno más denso, se refracta acercándose a la normal (perpendicular a la superficie de separación de los dos medios); si pasa de uno más denso a otro menos denso, se aleja de la normal. Los rayos de incidencia normal no se refractan.

Estudiando los fenómenos de refracción en las lentes convergentes, llegamos a las dos conclusiones siguientes:

1) Todo rayo que pasa por el centro de una lente no es refractado.

2) Todo rayo que no pasa por el centro es refractado creciendo la desviación con la distancia del rayo a aquel punto. A esto se debe que todos los rayos que inciden en dirección paralela sobre una lente convergente concurren, después de atravesarla, a un mismo punto llamado **foco**, porque también en él se concentrarán las radiaciones térmicas.

Distancia focal es la distancia que separa el foco del centro del lente.

Los fenómenos de refracción que acabamos de estudiar nos van a explicar la formación de las imágenes por las lentes. Puesto que todos los rayos emanados de un punto concurren al punto en que se cortan dos de ellos, fácil será construir la imagen de un objeto producida por una lente cuando se conozca la marcha que siguen en ésta los rayos luminosos. Distinguiremos dos clases de imágenes: **reales** y **virtuales**. Las reales están formadas por rayos convergentes y pueden recogerse sobre una pantalla. En las virtuales los rayos divergen y sólo prolongándolos posteriormente, es decir, en sentido contrario al de su propagación llegan a cortarse en una imagen, la cual, por ser mera creación subjetiva, no puede proyectarse sobre una pantalla.

De cuantos casos engendra la diversa posición relativa del objeto y la lente, elegiremos las dos pertinentes a nuestro propósito, a saber:

1) El objeto se halla a una distancia un poco mayor que la focal de una lente convergente. Este caso que, como veremos, co-

responde al objetivo del microscopio, nos suministra una imagen real, invertida y amplificada.

2) El objeto está situado entre la lente convergente y su foco. Tal ocurre en el ocular del microscopio que forma una imagen virtual, derecha y amplificada.

Combinando estas dos posiciones del objeto con respecto a la lente, se deduce fácilmente la

TEORÍA DEL MICROSCOPIO COMPUESTO. — Este consta de dos sistemas de lentes centrados, es decir, con el mismo eje óptico. La lente en cuya proximidad se sitúa el objeto se llama **objetivo** y **ocular** aquélla a la cual aplica el ojo el observador. La distancia focal del objetivo es relativamente corta, de manera que fácilmente se consigue poner el objeto algo más allá del foco para obtener una imagen real, invertida y amplificada. Dicha imagen cae entre el ocular y su foco y determina ya que aquel actúa como lupa, una imagen aun más amplificada, visible ya para el observador.

DESCRIPCIÓN DEL MICROSCOPIO. — Un microscopio consta, esencialmente, de:

- 1) *La parte mecánica.*
- 2) *El aparato de iluminación.*

3) *La parte óptica propiamente dicha*, constituida por el objetivo y el ocular, lentes que son los elementos fundamentales del microscopio.

1.—*Parte mecánica.* — Consiste en un **pie** de forma variable que asegura la estabilidad del instrumento, del cual parte la **columna** articulada con él para permitir una inclinación variable del conjunto. Sobre la columna se dispone una mesita llamada **platina** donde se coloca la preparación a observar. La platina lleva en su parte central un agujero por donde pasa la luz necesaria para iluminar la preparación; puede ser fija o móvil y calentable. En el extremo superior de la columna va a engranarse el **tubo**, que lleva las lentes, por medio de una **cremallera** que sirve para darle los movimientos rápidos. Más o menos al mismo nivel se encuentra el **tornillo micrométrico** que se utiliza para los pequeños movimientos, es decir, para enfocar exactamente el punto

deseado y para tener una visión de los diferentes planos de la preparación.

2.—*Aparato de iluminación.* — Para iluminar el objeto observable, en microscopía se utiliza:

- a) *Iluminación transmitida.*
- b) *Iluminación lateral (fondo oscuro).*

Nos referiremos a la primera, que tiene aplicación directa en el microscopio.

El aparato de iluminación, situado debajo de la platina, consta del **espejo**, el **diafragma** y el **condensador**. Como fuente luminosa puede utilizarse tanto la luz natural como la artificial a condición de obtener un cono luminoso homogéneo y bastante ancho.

El espejo es siempre doble, cóncavo por una cara, plano por la otra. Su objeto es reflejar la luz proveniente de la fuente luminosa y enviarla hacia la preparación bajo la forma de **cono de iluminación**.

El condensador, constituido por dos lentes convergentes, tiene por objeto ensanchar el cono luminoso, de lo que se deduce que su uso será indispensable cuando se trata de grandes aumentos.

El diafragma colocado debajo del condensador, regula el cono luminoso en el sentido de aumentarlo o disminuirlo.

3.—*Parte óptica propiamente dicha.*

Objetivo. — Es el órgano más importante del microscopio, porque además de producir el aumento principal del sistema, la nitidez de la imagen microscópica depende de la nitidez de la imagen producida por él. Es un sistema óptico centrado formado por una o varias lentes convergentes que produce, como sabemos, una imagen real y aumentada del objeto. Se atornilla en la parte inferior del tubo, sea directamente, sea por intermedio de un **revólver porta-objetivos**.

Distinguimos dos clases de objetivos:

- 1) *A seco.*
- 2) *De inmersión homogénea.*

Objetivos "a seco" son todos aquellos en los cuales existe aire entre la preparación y la lente. En éstos, muchos rayos luminosos no son aprovechados, porque al pasar de la lámina al aire y después al cristal del objetivo se refractan, ya que se trata de medios

cuyo índice de refracción es diferente; se pierde, entonces, la nitidez y la claridad de la imagen.

Este inconveniente se evita con los objetivos llamados "de inmersión", en los cuales se interpone entre la preparación y la lente un líquido cuyo índice de refracción es sensiblemente el mismo que el del cristal del objetivo.

Se puede emplear el agua, pero especialmente utilizamos hoy el "aceite de cedro" y hablamos en este caso de "inmersión homogénea" ya que el índice de refracción de esta substancia es igual al del vidrio y, por lo tanto, los rayos al salir de la preparación para dirigirse a la lente siguen por un medio homogéneo sin desviarse.

Ocular. — Es la lente a la cual aplica su ojo el observador y funciona como una lente convergente en la que el objeto está entre ella y su foco principal, objeto que no es otro que la imagen real producida por el objetivo a la que aumenta transformándola en virtual. Consta de dos lentes: una superior u ocular propiamente dicho que funciona como recién anotamos, y otra inferior o "lente de campo", que no contribuye en nada al aumento sino que tiene por objeto aclarar el campo al mismo tiempo que dilatar el perímetro observable de la imagen. Entre ambas existe un diafragma que suprime los rayos marginales.

Aplicaciones del microscopio en bacteriología. — El microscopio se utiliza en bacteriología para el examen y estudio de los gérmenes. Dos procedimientos deben seguirse:

a) Estudio del microbio al estado fresco, sin coloración, in vivo (nos indicará la forma, movimientos, rapidez de ellos, procesos de división, formación de esporas, yemación, etc.).

b) Estudio en preparaciones fijadas y teñidas con colorantes (nos permite apreciar en mejor forma detalles de la estructura bacteriana y otras características).

Cuidado que hay que tener con el microscopio. — Los oculares y objetivos deberán estar limpios para proceder a un examen. Al final, si se ha examinado con objetivo de inmersión, será preciso limpiar el aceite de cedro para evitar su desecación. Con un trozo de lienzo fino y limpio se frotará suavemente la lente de inmersión con bencina o xilol. Las preparaciones que contengan microbios al

estado fresco, una vez usadas, se arrojarán a un recipiente que contenga un antiséptico (por ejemplo: oxicianuro de mercurio).

ULTRAMICROSCOPIO

Está basado en la iluminación de fondo oscuro. Se ha observado que en la iluminación transmitida, la luz central ofusca el ojo del observador que sólo percibe aquellas partes suficientemente groseras u opacas para impresionarlo, de tal manera que es incapaz de apreciar pequeños detalles que por la excesiva luminosidad no alcanzan a diferenciarse.

En el ultramicroscopio se evita este inconveniente:

1) *Suprimiendo la llegada de rayos directos al ojo del observador.*

2) *Iluminando el objeto sin iluminar el ojo.*

Lo primero que se consigue por medio del **diafragma de fondo oscuro**, que intercepta la llegada de los rayos luminosos centrales. Lo segundo se obtiene usando condensadores especiales de fondo oscuro en los cuales los rayos luminosos sufren las reflexiones necesarias para no caer en el objetivo e iluminar el objeto. De manera que en la obscuridad del medio ambiente el rayo que va a sufrir la reflexión total, produce sobre la partícula ultramicroscópica una aureola de difracción que la rodea y la agranda hasta hacerla visible. Por lo tanto, con el ultramicroscopio no vemos las partículas sino que sabemos de su existencia, porque vemos la difracción luminosa que producen, de la que son base.

El ultramicroscopio se utiliza, sobre todo, para examinar "in vivo" microbios invisibles (sin coloración) por los procedimientos habituales. En la actualidad es de uso corriente en la investigación del treponema de la sífilis a partir de la serosidad obtenida directamente del chancro específico.

Técnica de los exámenes ultramicroscópicos. — Comprende sucesivamente los siguientes tiempos:

1º) *Disponer los aparatos para la observación en fondo oscuro.* Estos aparatos son, fundamentalmente, el **condensador de fondo oscuro**, el **objetivo diafragmado** y la **fuentes luminosa**. El

condensador de fondo oscuro viene a reemplazar al condensador de Abbé. En cuanto al objetivo pueden utilizarse tanto los objetivos a seco como los de inmersión diafragmados. La "fuente luminosa" debe ser muy poderosa para asegurar una buena iluminación "lateral". En estas condiciones el microscopio corriente queda transformado en un "ultramicroscopio".

2º) *Centrar el aparato de fondo oscuro*, hasta que coincida exactamente con el orificio de la platina.

3º) *Colocar la preparación*. Para su observación es indispensable depositar una gota de aceite de cedro sobre la cara superior del condensador y la inferior de la lámina para evitar las burbujas de aire. Para el objetivo de "inmersión diafragmado" depositar una gota de aceite de cedro sobre la laminilla como de ordinario.

4º) *Obtener el campo oscuro homogéneo*.

CAPITULO V

EXAMEN MICROSCOPICO DE LOS MICROBIOS

El examen microscópico, los cultivos y las inoculaciones experimentales constituyen los procedimientos fundamentales de investigación y diagnóstico bacteriológico.

El examen microscópico puede hacerse:

- 1) *Al estado fresco.*
- 2) *En preparaciones fijadas y coloreadas.*

1.—OSERVACIÓN AL ESTADO FRESCO. — Se utiliza este procedimiento para investigar ciertas funciones biológicas de los microbios, tales como la movilidad, la aglutinación, la yemación, la esporulación, sus agrupaciones características (cadenas, tetradas, etc.), sus relaciones con las células de pus, etc., lo que permite facilitar el diagnóstico de las distintas especies microbianas. Este procedimiento tiene la ventaja de no provocar modificaciones en los elementos que se examina.

El examen directo de los líquidos normales o patológicos (sangre, líquido céfalo-raquídeo, materias fecales, orina, pus, líquido pleural, ascitis, etc.), es muy importante porque permite estudiar su citología, parasitología y bacteriología. Pero es un procedimiento insuficiente porque debido a la transparencia de los gérmenes su refringencia se confunde con la de los líquidos; sus contornos se hacen menos netos mientras más elevado es el índice de refracción del líquido que los contiene; son muy visibles en los líquidos acuosos mientras que en los medios albuminosos o soluciones azucaradas concentradas su observación es difícil y aun imposible.

Esta observación puede verificarse:

- a) sin coloración,
- b) con coloración. (Coloración vital).

Sin coloración. — Si se trata de cultivo líquido o emulsión microbiana se coloca una gotita sobre una laminilla que se invierte y se fija con vaselina sobre una lámina excavada (**examen en gota colgante**); o bien se coloca entre lámina y laminilla. Si los gérmenes son muy escasos, dejar sedimentar o centrifugar. Si están contenidos en líquidos viscosos (pus, desgarró, etc.), se tratan con soluciones poco concentradas de soda o potasa para fluidificarlos antes de centrifugar. Las preparaciones en fresco se observan con objetivos a seco (números 4 ó 6).

Es también una observación al estado fresco el empleo del ultra-microscopio, que nos permite investigar los elementos figurados muy pequeños, como por ejemplo la Espiroqueta pálida de la serosidad del chancro sífilítico.

Coloración vital. — Como su nombre lo indica, permite observar los gérmenes coloreados al estado vivo. Esta coloración pone en evidencia ciertos elementos microscópicos sin alterarlos y permite observar detalles de estructura que el examen directo es incapaz de revelar. Se utilizan soluciones acuosas poco concentradas de colorantes que no tengan acción tóxica sobre los microorganismos tales como el rojo neutro, el verde de metiló, el violeta de genciana, el azul de metileno, etc. No hay una combinación entre el colorante y el germen sino una imbibición; sólo se colorean realmente las inclusiones celulares muertas.

Técnica. — Colocar una gota del cultivo, orina, serosidad, etc., sobre una lámina, agregar una gota de solución de rojo neutro al 1 x 1000, cubrir con una laminilla y cerrar con vaselina. También puede cubrirse con la laminilla la gota de la muestra y colocar una gota de colorante en un borde de la laminilla, la que penetra por capilaridad y tiñe los microbios. La coloración aparece lentamente, los núcleos se tiñen de color rosa y las inclusiones muertas de rojo vivo. Examinar al microscopio con objetivo a seco.

OBSERVACIÓN DE PREPARACIONES FIJADAS Y COLOREADAS. — El examen al estado fresco es incompleto en la mayoría de los casos, porque todos los elementos de la preparación tienen, más o menos, el

mismo índice de refracción. Para evitar este inconveniente y poder hacer un examen microscópico completo es necesario utilizar la coloración de los gérmenes y de los elementos que los acompañan. La coloración es imposible al estado vivo y para realizarla es necesario matar los gérmenes en forma instantánea para conservar sus caracteres y su estructura íntima en el momento de la muerte. Este procedimiento de muerte celular que es debido a la coagulación rápida del protoplasma, se denomina **fijación**. Para proceder a esta fijación es necesario hacer un **frotis** del cultivo o del producto patológico que se estudia, distendiendo una delgada capa del material sobre una lámina portaobjeto. Como sustancias fijadoras se usan el calor seco, el éter, los alcoholes etílico y metílico, el yodo, el ácido pícrico, el formol o bien mezclas de estas sustancias como el alcohol-éter (en partes iguales), o el líquido de Bouin (ácido pícrico, solución saturada, 75 c.c.; formol oficial, 20 c.c.; ácido acético, 5 c.c.), o el fijador de Zenker (agua destilada, 100 c.c.; bicromato de potasa, 2,5 c.c.; bicloruro de mercurio, 5 c.c.; sulfato de sodio, 1 c.c. En el momento de usarlo agregar ácido acético cristalizado, 5 gramos).

Substancias colorantes. — El origen de las materias colorantes empleadas en técnica microscópica es muy variado: algunas de origen animal, como el carmín, que se extrae del *Coccus Cacti*, que es un hemíptero parásito de un cactus de Méjico, y que es un producto rojo pulverulento y albuminoídeo. Otros se extraen de productos vegetales, como la hematoxilina, que es una sustancia cristalina, incolora o ligeramente amarillenta, que se extrae del palo de campeche (*Haematoxylon Campechianum*), que es una leguminosa arborescente de la América Central. La hematoxilina no tiene poder colorante, pero se oxida fácilmente dando la hemateína que cuando se une con una base se tiñe de color violeta. La mayoría de los colorantes son productos artificiales obtenidos por síntesis, como los colores de anilina, el azul de metileno, etc.

Desde Ehrlich se distinguen los **colorantes ácidos** que están formados por un ácido coloreado unido a una base incolora; éstos se fijan indiferentemente sobre el protoplasma y núcleo celulares. Se les llama **colorantes difusos** o **plasmáticos** (eosina, amarillo de anilina, etc.).

Los **colorantes básicos** están formados por una base coloreada unida a un ácido incoloro. Se fijan principalmente sobre la cromatina y se les llama **colorantes nucleares** (azul de metileno, fucsina básica, violeta genciana, etc.).

Los **colorantes neutros** reúnen las propiedades de los colorantes ácidos y básicos, y tiñen de variados colores los diferentes elementos citológicos; son los **colorantes panópticos** (azul de metileno, eosinato de azul de metileno, etc.).

Por lo general, los colorantes tiñen los elementos celulares con su propio color: la fucsina tiñe de color rojo, el azul de metileno de color azul, etc.; pero ciertos colorantes tiñen de diferentes colores los elementos celulares, como la tionina, que colorea de verde los glóbulos rojos, de color violeta rojo los núcleos celulares, etc. Esta propiedad se designa con el nombre de **metacromasia** (colorantes metacromáticos). Ejemplo: azul de toluidina, violeta de metileno, azul policromo.

En bacteriología se usa de preferencia los colorantes básicos que, como hemos visto, tienen afinidad electiva por los núcleos y, por consiguiente, por los microbios que, prácticamente, puede considerárselos como poseedores de un núcleo difuso.

Los colorantes básicos de uso más corriente en bacteriología son:

- Cristal violeta de Nicolle.**
- Fucsina fenicada de Ziehl.**
- Tionina.**
- Azul de metileno.**

Las "soluciones colorantes" en general se preparan con un tanto por ciento variable de materia colorante, un mordiente, o sea, una substancia que tiene por objeto aumentar la afinidad entre el colorante y los cuerpos celulares (ácido fénico, potasa, etc.), una pequeña cantidad de alcohol (10 % generalmente) y agua destilada. Las soluciones colorantes una vez preparadas se dejan 24 horas en reposo y se filtran antes de usarlas.

TÉCNICA DE PREPARACIÓN.

Fucsina fenicada de Ziehl:

Fucsina	1 gr.
Acido fénico	5 ..
Alcohol absoluto	10 c.c.
Agua destilada	100 ..

Triturar en un mortero la fucsina y el alcohol. Agregar el ácido fénico, triturar. Mezclar agregando poco a poco los dos tercios del agua destilada. Traspasar a un recipiente de vidrio. Lavar el mortero con el tercio del agua restante y añadirse a la mezcla anterior. Esperar 24 horas. Filtrar por papel filtro ordinario.

Cristal violeta de Nicolle:

Cristal violeta	1 gr.
Acido fénico	2 ..
Alcohol absoluto	10 c.c.
Agua destilada	100 ..

Preparar como la fucsina fenicada de Ziehl.

Azul de metileno:

Azul de metileno	2 gr.
Acido fénico	2 ..
Alcohol absoluto	10 c.c.
Agua destilada	100 ..

Preparar como la fucsina fenicada.

Con estas soluciones colorantes hacemos las "preparaciones" coloreadas, que pueden ser de tres tipos:

- I) *Coloración simple;*
- II) *Coloración por el método de Gram;*
- III) *Coloración por métodos especiales.*

I.—*Coloración simple.* — Consiste en hacer actuar sobre la preparación fijada un solo colorante. (Azul de metileno, tionina, etc.).

TÉCNICA:

- 1) Hacer el *frotis* sobre un porta - objeto limpio.

2) *Desecación.* — Se calienta ligeramente para no deformar los microbios.

3) *Fijación.* — Como fijador se puede usar el calor hasta 60°, el alcohol absoluto o el alcohol - éter.

4) *Coloración.* — Verter sobre la preparación el colorante necesario para cubrir completamente el frotis, dejando actuar de dos a cinco minutos.

5) *Lavar con agua.* Secar utilizando papel filtro y la llama. Observar con inmersión.

II.—*Coloración por el método de Gram.* — PRINCIPIO. — Los colorantes derivados de la para - rosanilina forman con el yodo una combinación estable; algunos bacterios poseen gran afinidad por esta materia colorante y no se desprenden de ella por la acción del alcohol (microbios que toman el Gram o **Gram positivos**); otros gérmenes, por el contrario, se decoloran fácilmente por el alcohol, (microbios que no toman el Gram o **Gram negativos**). Es este un método de coloración muy importante, porque permite diferenciar especies bacterianas diversas, morfológicamente parecidas. (Bacilo coli, Gram negativo y Bacilo diftérico, Gram positivo).

Para la coloración por este método se usa el **Violeta de Nicolle**, como colorante (solución hidró - alcohólica fenicada de cristal violeta). Se hace actuar en seguida la solución de **Gram** o **Lugol** (yodo metálico, un gramo; yoduro de potasio, dos gramos; agua destilada, doscientos gramos). Este reactivo hace el papel de mordiente. Viene después la decoloración que se hace por el **alcohol - acetona** (alcohol 2 partes, acetona 1 parte). Este tiempo es el que diferencia los microbios Gram positivos de los Gram negativos: los primeros resisten la decoloración con el alcohol - acetona mientras que los Gram negativos se decoloran totalmente bajo la acción del alcohol - acetona.

Se continúa la operación, utilizando un colorante de contraste: la fucsina de Ziehl, que colorea los microbios Gram negativos y los demás elementos de la preparación (glóbulos de pus, mucus, etc.).

TÉCNICA DE LA COLORACIÓN POR EL MÉTODO DE GRAM.

- 1, 2 y 3. — Como en la técnica de la coloración simple.
- 4.—Teñir con el violeta de Nicolle durante 1 o 2 minutos.

5.—Depositar solución de Gram. Mantenerla medio minuto.

6.—Decolorar con alcohol - acetona rápidamente. Lavar con agua.

7.—Fuxina de Ziehl diluída durante uno o dos minutos. Lavar con agua.

8.—Secar. Examinar con inmersión.

III.—*Coloración por métodos especiales.*

a) *Coloración de pulpa de órganos.* — Es un procedimiento rápido de investigar los gérmenes en las vísceras (bazo, hígado, sangre, etc.), de los animales inoculados y de los muertos por enfermedades naturales.

Se toma con una pinza un trozo de órgano (ganglio, bazo, etc.), y se frota suavemente sobre un porta - objeto, se seca y se fija con alcohol - éter; luego se hace la coloración.

- 1.—Coloración microbiana por el método de Gram.
- 2.—Coloración nuclear con hemateína (5 a 10 minutos).
- 3.—Coloración protoplasmática con eosina (2 a 3 minutos).
- 4.—Examinar con inmersión.

En estas preparaciones se observan las células y los microbios teñidos, pero no se ve la estructura histológica de los tejidos, porque ésta se destruye al hacer el frote.

b) *Coloración de los bacterios ácido - resistentes.* — Ciertos gérmenes presentan gran dificultad a la penetración de los colorantes básicos de la anilina a causa de una cápsula cérea especial que los reviste (Bac. de la tuberculosis, de la lepra, del esmegma, etc.). El procedimiento más corriente es la coloración de Ziehl - Neelsen, cuyo detalle se encontrará en el capítulo de tuberculosis.

c) *Coloración de esporas, cápsulas y cilios.* — Estos métodos serán descritos en el capítulo de morfología microbiana.

III.—INCLUSIONES Y CORTES DE ÓRGANOS

a) *Extracción y fijación de los órganos.* — Los trozos de órganos destinados a hacer los cortes deben extraerse del cadáver recientemente autopsiado, tener un tamaño de 10 a 15 milímetros por lado, introducirse inmediatamente en un frasco pequeño que contenga el líquido fijador.

Los líquidos fijadores más empleados son:

- 1) El alcohol absoluto (mantener durante tres días).
- 2) Formol comercial al 10% (durante uno o dos días).
- 3) Líquido de Bouin (formol comercial 20 c.c., solución acuosa saturada de ácido picrico 77 c.c., ácido acético cristalizante 5 c.c.) En este caso mantener el trozo de órgano 24 a 48 horas.

b) *Inclusiones en parafina.* — Los trozos de órganos fijados como se indica anteriormente, para incluirlos, deben ser sometidos antes a las siguientes operaciones:

- 1) Deshidratarlos en alcohol absoluto durante 24 horas.
- 2) Hacerlos transparentes mediante un baño de xilol.
- 3) Imbibirlos en una mezcla de parafina y xilol fusible a 35 grados (duración variable según el tamaño de las piezas).
- 4) Baño de parafina fusible a 52 - 54 grados. Colocar a la estufa graduada a 52 - 54 grados.

Viene la inclusión propiamente tal, que se hace en moldes de vidrio o metal y con parafina fusible a 52 - 54 grados fundida. Operar así: vaciar una pequeña cantidad de parafina en el fondo del molde (dejar enfriar ligeramente). Clavar el trocito de órgano con una aguja y colocarlo en el molde. Llenar el molde con parafina sin retirar la aguja. Dejar enfriar hasta que la parafina tenga consistencia. Retirar la aguja. Colocar el molde con la inclusión en un baño de agua fría hasta enfriamiento completo. Separar el molde de la inclusión.

c) *Cortes.* — Las inclusiones se cortan con aparatos llamados *micrótomos*, que se componen de un cuchillo para efectuar los cortes; un dispositivo especial para medir el espesor de los cortes (1, 2, 3, 4 ó más micrones); y una pieza metálica para sostener la inclusión.

Cada corte aparece como una delgada laminita de parafina semitransparente, conteniendo en el centro una parte más opaca que corresponde al órgano.

Para fijar estos cortes sobre una lámina se cubre ésta con una solución de gelatina, sobre la gelatina se deposita una gotita de agua y sobre el agua el corte. En seguida se calienta ligeramente el agua poniendo la lámina sobre la llama de reserva del mechero, con el objeto de distender el corte. Se retira el exceso de agua con papel filtro. Se calienta la lámina sobre una platina a 66 grados, más o menos, para fundir la parafina y pegar el corte.

Se deja la lámina a la estufa a 37 grados, durante 24 horas, para evaporar el resto de agua.

Para colorear:

- 1) Disolver la parafina con xilol, alcohol y agua.
- 2) Coloración de los microbios por el método de Gram.
- 3) Coloración nuclear con hemateína (5 a 10 minutos).
- 4) Coloración protoplasmática con eosina (2 a 3 minutos).
- 5) Secar. Bálsamo de Canadá. Cubre-objeto. Examinar con inmersión.

CAPITULO VI

MORFOLOGIA MICROBIANA Y ESTUDIO DE LOS CULTIVOS

MORFOLOGIA MICROBIANA

1.—FORMAS MICROBIANAS. — *Los bacterios o "esquizomicetos" son microorganismos unicelulares, sin clorofila, móviles o inmóviles, desprovistos de núcleo diferenciado y que se reproducen por división transversal o por esporas.*

Se distinguen cuatro formas fundamentales:

a) *Cocos.* — Pueden ser esféricos, lanceolados (Neumococo) o reniformes (Gonococo). Un coco puede encontrarse aislado, en grupos de a dos (**diplococos**); en grupos de cuatro (**tetrágenos**); agrupados en racimos (**estafilococos**), o en cadenas (**estreptococos**); pueden, también, agruparse en los tres planos del espacio constituyendo las **sarcinas**. Los cocos miden por término medio algunas décimas de micrón de diámetro.

b) *Bacilos.* — Son gérmenes más o menos alargados con forma de bastoncillos. Los hay largos y finos (B. tuberculosos); de un tamaño intermedio (B. disintéricos) y cortos (**coco-bacilos**). Sus extremos pueden ser rectilíneos (B. carbuncosa), redondeados (B. tífico) o abultados (B. diftérico). En otros el abultamiento se encuentra en la pared central (B. fusiforme). Se observan aisla-

dos, en grupos de dos (**diplobacilos**), o en cadenas (**estreptobacilos**).

c) *Vibriones*. — Son filamentos incurvados que forman sólo una parte de una circunferencia. Tienen el aspecto de una coma. (Vibrión colérico).

d) *Espirilos*. — Son filamentos con un número variable de espirales (*Spirillum nigrum*).

VARIACIÓN O DISOCIACIÓN MICROBIANA Y MUTACIÓN MICROBIANA. — De todos los seres vivientes, las especies microbianas parecen ser las más sujetas a variaciones morfológicas y fisiológicas por cambios en el medio en que se desarrollan.

Si modificamos las condiciones externas del medio (condiciones físicas, químicas, físico-químicas o biológicas), la morfología microbiana se altera más o menos profundamente. Así el *B. carbunco* (*Bacteridia de Davaine*), tiene en los órganos receptivos la forma de gruesos bacilos aislados y capsulados, en cambio en los medios líquidos artificiales se presenta sin cápsula y formando largas cadenas. El *B. piocianico* adopta diferentes formas cuando se cultiva en medios adicionados con diferentes sustancias. Toma la forma de largos filamentos en medios adicionados de bicromato de potasio; en medios con ácido bórico toma forma de espiral y forma de coco en medios adicionados de creosota. El *B. prodigiosus* se presenta en forma de cocos en los medios alcalinos y de bacilos rectos o espirales en el caldo adicionado de ácido láctico.

En los últimos años, desde los trabajos de Arkwright (1920) se ha dado mucha importancia al aspecto de las colonias, pues, se pudo comprobar que a partir de cultivos puros de microbios se desarrollaban colonias diferentes (variación o disociación microbiana). Efectivamente, a partir de colonias puras y bajo la acción del envejecimiento, las sales de litio, el antisuero homólogo, el bacteriófago y otras causas, se observa la formación de una **colonia lisa** denominada universalmente "S" (Smooth), por su aspecto regular y homogéneo, tanto en su superficie como en sus bordes y además **colonias rugosas** denominadas colonias "R" (Rough), por su superficie irregular y sus bordes dentellados. A estas variaciones morfológicas de las colonias corresponden también variacio-

nes morfológicas y fisiológicas de los microbios; así es posible observar que mientras las colonias lisas "S" permanecen virulentas, las colonias rugosas "R" están formadas por microorganismos avirulentos. En algunas especies microbianas, como el *B. Anthracis* y el *Estreptococo hemolítico*, las colonias "R" son virulentas y las colonias "S" han perdido su virulencia. Se observan, además, cambios en las propiedades antígenas de los gérmenes de las colonias disociadas.

TIPO LISO ("S")

- 1 Desarrollo en caldo: uniformemente turbio (homogéneo).
- 2 Emulsión estable en solución fisiológica.
- 3 Cilios y cápsulas evidenciables.
- 4 Movilidad (en caso de bacteria cilada).
- 5 Alta virulencia y toxicidad.
- 6 Resistencia a la fagocitosis.
- 7 Aglutinado por suero específico en grandes grumos (flocular).
- 8 Propiedades bioquímicas más activas.
- 9 Más frecuente durante la enfermedad.
- 10 Más común en infecciones agudas.
- 11 Sensible al envejecimiento.
- 12 Sensible al bacteriófago.

TIPO RUGOSO ("R")

- 1 Desarrollo en caldo: formación de grumos que sedimentan.
- 2 Aglutinación espontánea en solución fisiológica.
- 3 Frecuente ausencia de cilios y cápsulas.
- 4 Movilidad a menudo reducida o ausente.
- 5 Escasa virulencia y toxicidad.
- 6 Fácilmente fagocitables.
- 7 Aglutinados en pequeños y compactos grumos (granular).
- 8 Propiedades bioquímicas menos activas.
- 9 Más frecuente en portadores y convalecientes.
- 10 Más común en infecciones crónicas.
- 11 Resistente al envejecimiento.
- 12 Menos sensible al bacteriófago.

En la mayoría de los casos estas variaciones son "temporales" y la forma normal se restituye cuando cesa la acción de los factores externos que la provocaron. Estas modificaciones transitorias y reversibles de los bacterios se designan con el nombre de **variaciones microbianas**.

Cuando una modificación, una vez establecida, permanece constante aun llevando el germen a las condiciones primitivas, se habla de **mutación microbiana**. Así, por ejemplo, el *B. tuberculoso* cultivado en medio biliado pierde su acción patógena sin recuperarla jamás. (Calmette y Guerin).

La *disociación microbiana* consiste en la transformación total o parcial de un cultivo puro de tipo normal "S" en uno o más subtipos diferentes del original en sus caracteres culturales, morfológicos, serológicos, y bioquímico. El fenómeno se observa en los cultivos en medios sólidos y líquidos y puede estar acompañado por la desaparición rápida o lenta del cultivo madre.

1) *Disociación en medios sólidos.* — En los cultivos en medios sólidos el fenómeno se revela por la variación del tipo "S" a "R" e intermedarios; por la formación de colonias secundarias (*colonias hijas*), que pueden fácilmente observarse en los cultivos viejos del grupo coli-tifo-disentérico, gonococo, meningococo y en la gran mayoría de los gérmenes. Las colonias primitivas (*colonias madres*) sufren una especie de degeneración, se hacen traslúcidas en toda su superficie y sobre ellas se desarrollan numerosas colonias hijas en forma de papilas.

2) *Disociación en medios líquidos.* — En estos medios la disociación se produce mucho más activamente que en los medios sólidos; se acompaña de una disminución o pérdida total de los organismos tipo "S" y aumento de los gérmenes tipo "R"; esto puede ponerse en evidencia por siembras en agar.

AGENTES QUE PROVOCAN LA DISOCIACION MICROBIANA.

La disociación puede producirse espontáneamente o puede ser provocada por agentes químicos, físicos y biológicos.

Temperatura. — La temperatura por encima del óptimum térmico provoca la variación en muchas especies microbianas. La formación de pigmentos se inhibe; las propiedades fermentativas se alteran; desaparece la formación de cápsulas y esporas; se estimula la producción de colonias secundarias y de colonias tipo "R" en el grupo coli-tifo-disentérico; se producen variaciones serológicas en los cultivos de neumococo y estreptococo. Otro factor importante es la atenuación de la virulencia en los cultivos a 40 grados o más; el bacilo de la difteria cultivado a esa temperatura no es virulento, cambia su morfología y sus propiedades fermentativas. El bacilo del carbunco cultivado a 42 grados pierde la propiedad de producir esporas y se atenúa su virulencia.

Composición del medio de cultivo. — La adición de hidratos de carbono a los medios de cultivo facilita la variación microbiana. En los medios con dulcita, lactosa o rafinosa los bacterios del grupo intestinal dan lugar a la formación de papilas.

Cultivos viejos. — El envejecimiento de los cultivos es un factor que facilita la disociación microbiana. En los cultivos viejos de gérmenes del grupo coli-tifo-disentérico, aparece la formación de colonias secundarias y colonias "R".

Substancias antisépticas. — La influencia de los antisépticos sobre la variación microbiana es muy conocida. El fenol modifica la virulencia del bacilo del carbunco, altera las propiedades fermentativas y provoca la aparición de colonias tipo R del bacilo de coli. El mismo efecto tiene el formol.

Suero inmune o sangre inmune. — El bacilo del carbunco pierde su virulencia cuando se cultiva en presencia de su antisuero; el bacilo tífico de tipo normal "S" cultivado en las mismas condiciones se transforma en tipo "R" que conserva o pierde su poder aglutinante. El neumococo virulento capsulado pierde su virulencia y su cápsula y se hace fácilmente fagocitable cuando se cultiva en presencia de su antisuero, al mismo tiempo que se observa la aparición de colonias "R" avirulentas.

FORMAS DE INVOLUCIÓN. — Se consideran formas de degeneración que aparecen cuando los bacterios crecen en medios desfavorables, o por envejecimiento (formas en masa, pera, raqueta, huso, ramificadas, etc.).

2.—*DIMENSIONES.* — Su longitud varía desde 0,2 a 0,3 micrones hasta 30-50 micrones (sulfobacterios). Algunas especies tienen dimensiones tan reducidas que escapan a la observación microscópica y ultramicroscópica. Su existencia sólo se evidencia por la virulencia de los humores que las contienen. Son los **ultramicrobios**, llamados también **virus filtrables**, porque atraviesan los filtros de porcelana (o de Chamberland) o de tierra de infusorios (o de Berkefeld). Hoy se los engloba bajo la designación de **inframicrobios**.

3.—*PESO.* — Por métodos ingeniosos se ha calculado el peso de algunos bacterios: así el B. coli pesa 0, mgr. 000.000.006.13. El peso de un B. tuberculoso es de 25 cien millonésimos de milígramo.

4.—*ESTRUCTURA.* — Están constituídos por una membrana más o menos delimitada o ectoplasma y un contenido o endoplasma que carece de un núcleo diferenciado.

a) *Membrana o ectoplasma.* — En ciertos gérmenes de protoplasma finamente granuloso, la membrana puede observarse directamente por un examen al estado fresco, en otros sólo se puede distinguir después de la retracción del protoplasma por la influencia del calor o del alcohol. Se distingue con más nitidez durante la formación de las esporas y por el fenómeno de la plasmolisis. En este último caso la membrana se separa del contenido protoplasmático haciéndose más visible. Es, en general, resistente y asegura a

los gérmenes en condiciones normales cierta persistencia en su forma. Se le distingue una capa externa de aspecto gelatinoso y mal delimitada (capa gelatinosa) y otra interna, delgada, considerada como la verdadera membrana (capa cuticular).

b) *Contenido o endoplasma.* — En los gérmenes más pequeños tiene una apariencia homogénea, pero en realidad, lo mismo que el protoplasma de los seres superiores, representa un sistema coloidal complejo. En algunas especies se ha podido identificar ciertas masas cromáticas que recuerdan el núcleo (**núcleo cromidial**); en otras se encuentran vacuolas, inclusiones de naturaleza y funciones mal conocidas (**corpúsculos metacromáticos**), pigmentos, sustancias proteicas, lipoides, cristales, azufre, etc.

c) *Organos de locomoción.* — Cilios, flagelos. — Son filamentos finos, frágiles, generalmente más largos que el cuerpo bacteriano. Poco o nada visibles al examen directo, se les pone en evidencia por métodos especiales de coloración.

Son órganos de motilidad cuyo mecanismo estaría en relación con las variaciones de la tensión superficial en contacto con el medio ambiente. Son influenciados por todos los excitantes: mecánicos, térmicos, luminosos, eléctricos, etc.

d) *Cápsulas.* — Ciertas especies microbianas están envueltas en una vaina de aspecto hialino que incluye a uno o varios microorganismos a la vez. A veces quedan englobadas grandes masas de gérmenes (**zoogleas**).

Sólo algunas especies la producen y, en todo caso, están en relación con la virulencia, las condiciones de cultivo y la composición de los medios (presencia de líquidos orgánicos). En su estructura química parecen entrar hidratos de carbono y sustancias del tipo de las mucinas. Generalmente se les atribuye el papel de órgano de protección y desempeñan un rol de antígeno incompleto (hapteno).

COLORACION DE CAPSULAS. — Método de Johnne.

Solución acuosa al 2 por ciento de Violeta de Metilo o Violeta de Genciana durante 1 ó 2 minutos. Lavar rápidamente al agua (2 segundos). Tratar por una solución al 1 por ciento de ácido acético durante 10 segundos. Lavar al agua. Examinar por inmersión.

e) *Esporas.—Endosporas.*— Representan una forma de resistencia y de reproducción del ciclo evolutivo de algunas especies microbianas. Constan de una membrana gruesa y resistente y una masa protoplasmática refringente y condensada (menor cantidad de agua que el protoplasma del germen que le dió origen). Se disponen: en la parte media del cuerpo bacilar (central) o en uno de sus extremos (polar). Generalmente cada germen da una sola espora. Los métodos de tinción de esporas se basan en la dificultad con que toman los colorantes y en que una vez teñidas, resisten a la acción de los decolorantes más enérgicos.

COLORACION DE ESPORAS. Método de Moller.—

Fijación: 2 minutos alcohol absoluto; 2 minutos, cloroformo. Sin lavar hacer actuar el ácido crómico al 5 por ciento, 5 minutos. Hacer la coloración en caliente por la fuxina de Ziehl. Decoloración por ácido sulfúrico al 5 por ciento, 5 segundos y después por alcohol absoluto. Lavar al agua. Recoloración con la solución acuosa al 1 por ciento de azul de metileno $\frac{1}{2}$ minuto. Lavar al agua.

ESTUDIO DE LOS CULTIVOS

Para una determinada especie microbiana varía según el medio de cultivo elegido y según el procedimiento empleado en la siembra.

1.—EN LOS MEDIOS SÓLIDOS:

En primer término se investigará el olor: fecaloideo (*B. coli*); olor agradable sui generis (*B. de Koch*); etc. En seguida si ha habido cambios en la coloración del medio por la secreción de pigmentos difusibles; *B. piociánico* (color azul verdoso). Finalmente si la siembra se ha hecho en profundidad, observar si en ésta ha habido desarrollo, con o sin producción de gas, burbujas, rupturas del medio.

a) *Desarrollo en estria.* — Se pueden observar los caracteres de fermentación, producción de pigmento y hemolisis.

b) *Colonias aisladas.* — En general revisten los siguientes caracteres: Dimensiones: para un tiempo determinado (24 ó 48 horas) son muy variables de una especie a otra. Forma: Redondas

(Estafilococos, Estreptococos); de bordes sinuosos (vibrión colérico); lobuladas y de aspecto filamentosos (B. del carbunco); agrietadas (B. tífico), etc. Transparencia: Colonias transparentes como gotas de rocío (Neumococo, B. de la peste); opacas (B. disentéricos). Color: Incoloras (Neumococo); pigmentadas (Estafilococo, B. prodigiosus).

c) *Desarrollo en picadura*. — Algunas especies crecen sólo en la superficie y nada o muy poco en la profundidad (aerobios estrictos). Otros casi exclusivamente a lo largo del trozo de punción: bacilo del Tétanos, Vibrión séptico. Finalmente, muchas especies se desarrollan tanto en la superficie como en la profundidad (cultivos en clavo): Neumobacilo; B. coli.

Podrá observarse en seguida si hay o no liquefacción del medio (gelatina, suero coagulado). Generalmente comienza en la superficie como un disco o cúpula que se va profundizando lentamente hasta invadir la totalidad del medio: (Bacilo del carbunco; B. piocianico, etc.).

El desarrollo a lo largo del trozo de punción puede hacerse: linealmente: Neumobacilo, Bacilo de la peste; en forma de un punteado más o menos confluyente: B. disentérico; con prolongaciones laterales: B. del carbunco.

El desarrollo en la superficie se presenta como un disco más o menos extenso muy poco característico.

2.—EN LOS MEDIOS LÍQUIDOS:

a) *Caldos*. — Primeramente se investigará el olor del cultivo; los cambios de color que haya podido experimentar, y las modificaciones de la reacción.

El medio puede enturbiarse: B. coli, Estafilococo, o permanecer transparente: B. subtilis, Estreptococos.

Habrà o no formación de un velo en su superficie; espeso: B. subtilis. Neumobacilo; delgado: B. diftérico; replegado: B. de Koch; ascendente: B. de Koch; seco: B. subtilis; húmedo y brillante: Neumobacilo.

Algunas especies forman filamentos en la superficie o contra las paredes del tubo (B. carbunco). Otras forman grumos más o

menos grandes que pueden permanecer en suspensión o caer al fondo del tubo (B. de la peste).

Por lo general, en los cultivos viejos se forma en el fondo del tubo un depósito más o menos abundante, según las especies.

b) *Leche*. — Si el germen se desarrolla en este medio se pueden presentar tres modalidades:

- 1º Desarrollo del microbio sin modificación del medio;
- 2º Coagulación: a) por acidificación; b) por fermento lab;
- 3º Digestión o no de la caseína.

3.—EN LOS MEDIOS DIFERENCIALES:

Aquí, además de los caracteres anteriormente enumerados, se revelan las propiedades bioquímicas inherentes a cada especie microbiana; fermentación de los azúcares en los medios tornasolados, propiedades reductoras en los medios con rojo neutro, etc. Acción proteolítica en los medios a base de gelatina, carne, huevo, etc. Acción hemolítica en los medios con sangre; caldo-sangre, agar-sangre, etc.

CAPITULO VII

INOCULACIONES Y AUTOPSIAS

INOCULACIONES

La inoculación experimental utilizada por primera vez por Pasteur es uno de los métodos de investigación y diagnóstico bacteriológico. Tiene múltiples indicaciones:

Precisar el agente específico de una enfermedad, (postulados de Koch).

Completar el estudio de un germen de especie conocida o desconocida.

Aumento y, a veces, atenuación de la virulencia.

Preparación de sueros específicos (aglutininas, hemolisinas, etc.)

Se utiliza también para el aislamiento microbiano, porque el organismo de algunos animales tiene una afinidad electiva para ciertos gérmenes (laucha blanca para el Neumococo, cuy para B. de Koch tipo humano, etc.), de modo que si se inocula una mezcla de varios microbios de un producto patológico (esputo) o de un cultivo, la especie de elección predomina mientras que las otras son eliminadas por fagocitosis; porque son los más próximos al hombre en la escala zoológica y, por lo tanto, más receptivos a los agentes patógenos, se utilizan de preferencia los mamíferos; se eligen los más pequeños porque son más fáciles de manejar y de conservar en el laboratorio: (cuyes, ratas, conejos, lauchas); además, se suelen emplear las aves: (gallina, paloma); anfibios: (rana, sapo); reptiles, etc.

Material a inocular. — Puede inocularse cultivos o productos patológicos al estado líquido o sólido; los líquidos se inyectan directamente, los sólidos es necesario emulsionarlos en suero fisiológico y, a veces, (trozos de órganos), triturarlos en un mortero para disociarlos completamente y hacer las emulsiones.

Contención. — Varía con las diferentes especies animales empleadas. Los ratones y lauchas se sostienen con pinzas especiales de dimensiones variables; se los toma por la piel de la nuca y por la base de la cola para inmovilizarlos. Los cuyes y conejos los mantiene en sus manos un ayudante en las operaciones corrientes; en caso de intervenciones delicadas (laparotomías, colocación de sacos de colodión en el peritoneo, etc.), se fijan en una palangana de cobre o zinc de diferentes tamaños, de bordes levantados y perforados. Las cuatro patas se fijan por nudos corredizos, amarrando el extremo de cada cuerda a uno de los orificios mencionados. Para animales más grandes, como gatos y perros, existen aparatos utilizados especialmente en fisiología (aparato de Latapie, de Debrand). Los animales de mayor tamaño, como monos, buey, caballo, etc., se inmovilizan por variados recursos de técnica.

Preparación de la región a inocular. — **Depilación.** — Los pelos deben cortarse mediante las tijeras curvas o bien rasurar. Una vez eliminados los pelos, se desinfecta la piel con tintura de yodo, dejando el tiempo necesario para que penetre las capas epidérmicas.

Anestesia. — Toda operación delicada o que genere dolor, debe hacerse bajo anestesia.

El empleo de cloroformo es a menudo peligroso en los animales, particularmente en el conejo. Los otros animales de laboratorio lo soportan bastante bien. Se coloca un algodón empapado en cloroformo dentro de un embudo metálico que tiene un extremo cerrado con una rejilla. El otro extremo se aplica al hocico del animal, de tal manera que el aire que penetra a través de dicha rejilla se mezcle con vapores emitidos por el cloroformo.

Instrumental. — Bisturíes, tijeras, pinzas, agujas de Deschamps, agujas de sutura, jeringas, agitadores, pipetas Pasteur, algodón, etc., todo debe estar perfectamente esterilizado.

VÍAS DE INOCULACIÓN. — Las más frecuentes son:
Intradérmica e intramucosa. (escarificar la región y extender el virus o la toxina obligándola a penetrar por fricción).

Subcutánea, (hacer un pliegue de la piel, introducir la aguja evitando la penetración muscular).

Intramuscular, (hundir profundamente la aguja en las masas musculares del muslo).

Intravenosa, (vena marginal de la oreja en el conejo, safena del perro, axilar de las aves, etc.).

Intraperitoneal, (tomando las precauciones posibles para no perforar el intestino).

Intrapleural.

Intraarticular.

Intraraquídea.

Intracerebral.

Ocular, (conjuntiva ocular y cámara anterior del ojo).

Digestiva, (ingestión y vía rectal).

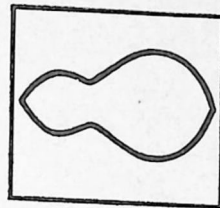
Respiratoria, (pulmonar, intratraqueal, pleural, inhalación, etc.).

Punción cardíaca. — Este procedimiento se emplea para obtener sangre fresca, aséptica, ya sea con el fin de obtener alexina o para la preparación de medios de cultivo. Se coloca el animal en decúbito dorsal, se asepsia la región precordial con tintura de yodo, previa eliminación de los pelos. El punto de reparo para la punción intracardiaca en el conejo está situado en el tercer espacio intercostal izquierdo a tres milímetros del borde esternal del mismo lado a cuyo nivel se cae en el ventrículo derecho. En el cobayo el punto de elección está a 8 ó 10 milímetros por encima del vértice del ángulo formado por la base del apéndice xifoides y el último cartilago costal articulado con el esternón y sobre el borde izquierdo. La aguja debe introducirse a 15 ó 17 milímetros de profundidad, por encima de la penúltima articulación condroesternal, en el sentido oblicuo de delante hacia atrás, llegando en esta forma al ventrículo izquierdo.

La cantidad de sangre extraída no debe pasar más allá de 10 c.c. para los cuyes y de 25 c.c. para los conejos adultos; debe usarse una aguja de bisel corto para evitar la hemorragia intra - pericardiaca.

Observación de los animales.—Los animales inoculados (cuyes, conejos) se marcan con números metálicos fijados en las orejas, y otras veces (lauchas, ratones), se marcan con tintas de diferentes colores. Deben mantenerse enteramente aislados de otros animales sanos o enfermos, alejados de toda causa de infección extraña, en jaulas metálicas fáciles de asear, desinfectar y transportar y al abrigo

UNIVERSIDAD DE CHILE
 ESCUELA DE CIENCIAS MEDICAS
 Bacteriología - Inmunología
 PROF. HUGO VACCARO



Informe N° _____
 Fecha de la Inoculación: _____

Procedencia: _____
 Muestra de: _____
 Investigación: _____

Procedimiento: _____
 Especie: _____ Sexo: _____ N°: _____

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
Fechas		Días		42°		41°		40°		39°		38°		37°		36°		35°													
Pesos																															

del frío y de la humedad. Debe llevarse un protocolo para cada animal inoculado donde se anotan diariamente los fenómenos digestivos, nerviosos, estado de la orina, etc.

Durante la enfermedad provocada por la inoculación, si es necesario examinar la sangre, (humores o productos patológicos), deben tomarse las muestras asépticamente para evitar errores de diagnóstico.

AUTOPSIAS

Si es necesario sacrificar el animal para estudiar las lesiones, se emplea el cloroformo, el éter o el gas. La autopsia debe hacerse lo más pronto posible después de la muerte, pues los órganos y tejidos se dejan invadir pronto por el B. Coli y el B. Proteus (infección cadavérica). El cadáver debe fijarse en una inmovilidad tan absoluta como sea posible, en decúbito dorsal, generalmente; las lauchas se colocan sobre un piso de corcho y se fijan las patas y el hocico con alfileres, los cobayos y los conejos se amarran de las patas a los bordes de la bandeja metálica, en la forma ya indicada; las aves se fijan por el cuello y por las patas. Quemar los pelos o plumas de la región abdominal - torácica. Humedecer con un antiséptico o alcohol toda la región a incindir.

Se hace una incisión cutánea mediana, desde el cuello al pubis, que se completa por incisiones perpendiculares a la primera, una a nivel de los miembros superiores y otra a nivel de los miembros inferiores. Se exploran en seguida las diversas partes del cuerpo observando especialmente el punto de inoculación si ésta ha sido intradérmica o subcutánea.

Se separa, entonces, la piel de las partes subyacentes, rechazándola hacia afuera; la pared muscular del tórax y del abdomen, puesta así al desnudo, se abre primero el tórax seccionando de abajo hacia arriba la pared costal izquierda y derecha a 2 cms. por fuera del esternón, se incinde el diafragma y se levanta hacia arriba la pared torácica anterior; se observa el estado de las pleuras y de los pulmones, del pericardio y de los ganglios mediastínicos; para extraer asépticamente la sangre del corazón se toma su extremidad con una pinza, se quema un punto de su pared exterior con un vástago metálico o de vidrio, calentado al rojo, se introduce por el mismo punto cauterizado una pipeta en la cavidad cardíaca y se aspira suavemente la

sangre, dando a la pipeta un ligero movimiento de vaivén, en seguida se retira.

A continuación se abre el peritoneo con las tijeras, examinando detenidamente su estado y recogiendo la serosidad que se encuentre; en seguida se revisan todos los órganos de la cavidad abdominal y los ganglios mesentéricos e ilíacos. Las muestras de productos patológicos o trozos de órganos para examen directo, cultivo o inoculaciones en serie deben tomarse asépticamente.

Para examinar el tubo digestivo es preciso hacer una ligadura por encima del cardias y otra en el recto; desprender enteramente y abrir con tijeras romas: ver el contenido y la pared

En cuanto a los órganos pelvianos, es conveniente aspirar la orina de la vejiga y examinar y abrir los órganos genitales.

Si se desea examinar médula ósea, es recomendable seccionar el esternón, cauterizar la superficie de sección y extraer contenido profundo (cultivo e inoculación).

Los cadáveres de los animales autopsiados se destruyen en el horno crematorio, por el ácido sulfúrico o se esterilizan en el autoclave.

TEMPERATURAS Y PESOS NORMALES DE LOS ANIMALES DE EXPERIENCIAS

Las temperaturas de los animales de laboratorio oscilan con respecto a la normal en un ritmo variable para cada especie y aun para cada individuo, por lo cual es aconsejable establecer tales variaciones antes de iniciar una experiencia.

TEMPERATURA RECTAL MEDIA

Cuy	39° 2
Conejo	39° 5
Perro	39° 2
Gato	38° 8
Caballo	37° 7
Pollos y palomas	42° 5

PESO DE LOS CUYES SEGUN EDAD

Al nacer	74	gts.
5º día	98	..
10º ..	137	..
20º ..	196	..
1 mes	250	..
2 ..	350	..
3 ..	450	..
4 ..	550	..
6 ..	650	..

CAPITULO VIII

FISIOLOGIA MICROBIANA

Estudiaremos algunas funciones microbianas demostrables prácticamente y de suma importancia en la identificación de los gérmenes y acción "in vivo".

I.—RESPIRACIÓN

El oxígeno es indispensable a los microbios para vivir y lo toman ya sea al estado libre (aire) o en disolución, o bien en combinación con otras substancias en los medios que viven. (Ver diastasas oxidantes). Aquellos que necesitan O libre o disuelto para su vida y actividades fisiológicas, se llaman **aerobios**. Es tanta la avidez de O de algunas especies, que forman velos plegados en la superficie de los medios líquidos y muchas veces ascienden por las paredes del tubo (B. subtilis, B. de Koch) en busca de aire. **Anaerobios** son los microbios que no pueden vivir en contacto del aire. Pueden ser **anaerobios estrictos**, (Vibrión séptico, B. sporogenes), que requieren para su desarrollo medios estrictamente privados de aire (O libre), o bien **anaerobios facultativos** (B. coli y B. tíficos) que crecen de preferencia en aerobiosis pero que pueden desarrollarse igualmente bien en medios sin aire. Muchas especies son anaerobios recientemente aisladas del organismo para pasar a ser aerobias después de algunos pasajes (estreptococos, enterococos). Por eso es recomendable sembrar los productos patológicos en medios anaerobios en los diagnósticos bacteriológicos.

II.—PRODUCCIÓN DE DIASTASAS, FERMENTOS SOLUBLES O ENZIMAS

Son elaboradas en el protoplasma de los gérmenes. Son sustancias de composición química desconocida, que poseen la propiedad de modificar en dosis ínfimas (por descomposición o síntesis), cantidades considerables de materia orgánica sin alterarse ni destruirse en el curso de las reacciones. El papel de las diastasas es múltiple: transforman las sustancias complejas en elementos simples, solubles y asimilables; desdoblan los compuestos fermentescibles generando calorías utilizables para otras reacciones; presiden las acciones que permiten elaborar y renovar la propia materia viva. Son sustancias solubles en agua y glicerina. Precipitan por el alcohol absoluto, dializan mal. Su acción es máxima a temperatura de 38 a 40 grados; cada diastasa tiene un *máximum*, un *mínimum* y un *óptimum* térmico; se destruyen por calentamiento entre 55 y 80 grados, y por la acción prolongada de la luz. El frío (190 grados) no las altera. Los antisépticos que destruyen los gérmenes no tienen ningún efecto sobre las diastasas. Cada microbio puede secretar varias diastasas, pero una predomina e imprime a las reacciones su carácter específico. Inversamente varios gérmenes pueden generar diastasas idénticas. Igual que los pigmentos y toxinas, las diastasas pueden difundirse en el medio ambiente (exodiastasas) o quedar en el interior del protoplasma (endoenzimas). Según sus propiedades, se dividen en:

- DIASTASAS:
- a) *Amilolíticas*. (*Amilasa*, *invertina*, *celulasa*).
 - b) *Proteolíticas*. (*Pepsina*, *tripsina*).
 - c) *Lipolíticas*. (*Lipasas*).
 - d) *Oxidantes*. (*Oxidasas*).
 - e) *Reductoras*. (*Hidrogenasa*).
 - f) *Citolíticas*. (*Hemotoxina*, *leucotoxina*).

a) *Diastasas amilolíticas*.—Descomponen los hidratos de carbono. La transformación de los hidratos de carbono, (almidón, azúcares) en sustancias simples por acción de las diastasas amilolíticas, se denomina **fermentación**. En oposición a las **diastasas** o **fermentos solubles** se da el nombre de **fermentos figurados** a los microorganismos de la fermentación: hongos (*Aspergillus Niger*, *Mucor*), levaduras, que son los verdaderos fermentos alcohólicos que desplazan la mo-

lécula de azúcar y la transforman en alcohol y CO₂, lo que también pueden efectuar algunos microbios, y "fermentos lácticos". (*B. bulgaricus*, *caucasicus*, etc.), que dan origen especialmente a ácido láctico. Los bacterios agentes de la fermentación láctica, butírica, acética, juegan un rol más considerable todavía en la transformación de la materia orgánica, y son industrialmente empleados en la fabricación de diversos productos (quesos, mantequilla, elaboración de tabaco, vinagre, etc.). Es interesante señalar que el predominio de la flora sacarolítica en el intestino provoca el cuadro de las diarreas de fermentación.

EJEMPLOS DE DIASTASAS AMILOLITICAS:

La *amilasa* o *dextrinasa* que transforma el almidón en maltosa y glucosa: la *invertina* que desdobla el azúcar de caña y betarraga (sacarosa) en glucosa y levulosa. Según su acción sobre un azúcar determinado, se denomina *inulasa* la diastasa que ataca la inulina, *lactasa* la que ataca la lactosa, etc.

La fermentación de los azúcares por la acción de las diastasas es importante en la identificación de los gérmenes. En el Laboratorio se pone de manifiesto en medios diferenciales sólidos y líquidos agregando al medio de cultivo el azúcar que se estudia y una sustancia colorante como indicador (tintura de tornasol hasta color azul claro). Como en la fermentación de los azúcares hay siempre producción de ácidos, el azul de tornasol vira al rojo por su presencia. Esta fermentación puede efectuarse con o sin producción de gases, lo que se demuestra empleando los medios de cultivo líquidos con el tubito en campana o tubo B. (Besson). La producción de gases se manifiesta por su presencia y acumulación en la campana. En medios sólidos se emplean placas de Petri, tubos de agar tendido tornasolado al que se agrega el azúcar en estudio. Las colonias que fermentan viran el azul de tornasol al rojo por producción de ácidos. Algunos microbios, (*B. de Friedlander*), fermentan los azúcares dando coloración roja, después cesa la fermentación, continúan transformando en amoníaco las sustancias nitrogenadas del medio, la reacción pasa a ser definitivamente alcalina y, por lo tanto, el medio vuelve a su color azul. Este fenómeno se llama "camelonaje".

b) *Diastasas proteolíticas*. — Transforman las albúminas de

la carne, la caseína, el suero coagulado, la ovo-albúmina, la gelatina, la fibrina y aun los tejidos vivos, etc., en sustancias simples, solubles y asimilables por los microorganismos.

Este fenómeno se llama "proteolisis" y los gérmenes que lo producen "proteolíticos".

Desintegran la materia proteica produciendo amoniaco que comunica al medio una reacción alcalina creciente.

Estas diastasas son producidas por microbios aerobios y anaerobios que obran sobre las albúminas, peptonas y amino-ácidos dislocando la materia proteica hasta la producción de amoniaco con o sin desprendimiento gaseoso y formación de indol, fenol, escatol, derivados sulfurados, leucina, tirosina y ptomainas diversas. Este mismo proceso al verificarse en el organismo da lugar a las diarreas de putrefacción, (autointoxicaciones intestinales).

Entre los productos de desintegración de las albúminas se encuentran el indol y el H₂S, cuya presencia es necesario investigar en los medios de cultivo para identificación de algunas especies.

EJEMPLOS DE DIASTASAS PROTEOLITICAS:

a) *Acción sobre la caseína.* — La caseína, producida por ciertos gérmenes: (B. Proteus, B. anthracis, B. Megaterium, B. Píocianico, etc.), digiere en medio neutro o alcalino la albúmina de la leche solubilizándola.

b) *Acción sobre las carnes, albúmina de huevo y fibrina.* — Son disgregadas por tripsinas, pepsinas, proteasas, que actúan en medio neutro o alcalino hasta producción de amoniaco. (anaerobios de la gangrena gaseosa).

c) *Acción sobre la gelatina.* — La gelatinasa produce la liquefacción total o parcial del medio: (B. Proteus, Estafilococo, B. piocianico, etc.).

d) *Acción sobre la urea.* — La transformación de la urea en carbonato de amoniaco se efectúa por acción de la ureasa o fermento de la urea. (Micrococcus urae).

Putrefacción. — La idea vulgar de putrefacción corresponde a la dislocación de las sustancias proteicas disgregadas por los aerobios y anaerobios mediante las diastasas proteolíticas que entran en juego sucesivamente (proteasas, tripsinas, erepsina, amidasa para las materias albuminoideas; lipasas para las grasas y zimadas para los H. de C.).

En la naturaleza los cadáveres de los animales y de las plantas y todos los productos de desecho sufren el mismo proceso de putrefacción y una vez que la materia orgánica se disgrega total-

mente hasta la producción de las sustancias químicas más simples, empieza nuevamente la elaboración de la materia orgánica, las bacterias nitrificantes del suelo y del aire oxidan los compuestos amoniacales y los transforman en nitritos y después en nitratos asimilables por las plantas con clorofila; estas plantas toman el C. del ácido carbónico del aire para formar sus albúminas, sus hidratos de carbono y sus grasas.

El proceso de putrefacción no sólo se efectúa en la materia orgánica muerta; hay gérmenes que, solos o asociados, son capaces de producir la putrefacción "in vivo" (infecciones pútridas, gangrenas gaseosas), por medio de sus diastasas amilolíticas, proteolíticas, lipolíticas, etc.

c) *Diastasas lipolíticas.* — Desdoblan las grasas en glicerina y ácidos grasos que son atacados principalmente por los hongos.

d) *Diastasas oxidantes.* — La transformación del alcohol en ácido acético, de las sales amoniacales en nitritos y de éstos en nitratos, la saponificación de las grasas, son procesos de oxidación. Las oxidasas tienen como principal objeto suministrar el oxígeno en forma activa: O nascente.

e) *Diastasas reductoras.* — Los fermentos reductores parecen existir en todas las células vegetales y animales. Los extractos de gérmenes obtenidos por trituración con arena y agua, poseen propiedades reductoras. La transformación de nitratos en nitritos, la producción de H₂S, la decoloración de los medios adicionados de tornasol, rojo neutro, etc., son fenómenos de reducción. Los colorantes, tales como el azul de metileno, los transforman en un producto inoloro: los "lens-derivados".

Los anaerobios son poderosos reductores: transforman los sulfatos en sulfuros, el ácido arsenioso en hidrógeno arseniado, etc.

f) *Diastasas citolíticas.* — Hoy día se las considera como toxinas parciales llamándolas **Hemotoxinas** y **Leucotoxinas**.

Hemolisinas o **hemotoxinas.** — Venenos microbianos que disuelven los glóbulos rojos liberando la hemoglobina (Streptococcus hemolyticus, B. Perfringens).

Para demostrar las propiedades hemolíticas se utiliza el agar -

sangre desfibrinada (de cuy o de conejo). En este medio las colonias de microbios hemolíticos aparecen rodeadas de una zona colorada por destrucción de los glóbulos y descomposición de la hemoglobina.

Leucocidinas o leucotoxinas. — Venenos microbianos cuya acción lítica se ejerce en particular sobre los glóbulos blancos destruyendo el protoplasma y el núcleo. La degeneración de los glóbulos blancos en el pus (**glóbulos de pus**), es debida a la acción de las leucocidinas (*Estafilococo piógeno*).

III.—PRODUCCIÓN DE PIGMENTOS O CROMOGÉNESIS

Hay variedades microbianas cromógenas, es decir, productoras de pigmentos. Los pigmentos son sustancias químicas de naturaleza poco conocida, algunos solubles en agua y en los medios de cultivo, otros en éter, cloroformo, alcohol y sulfuro de carbono, es decir, en los solventes de las materias grasas, por lo que se les llama "lipocromos". Algunos pigmentos son difusibles y pasan a los medios de cultivo (*Piociánico*), otros quedan adheridos a la célula microbiana (*B. "endógenos"*), como las endotoxinas (*Estafilococo dorado*). Su formación depende de muchos factores: luz, aire, temperatura, reacción y composición química del medio. Es una propiedad susceptible de disminuir o desaparecer según las condiciones de cultivo: Los colores son de lo más variados: blanco de porcelana (*Estafilococo blanco*); rojo (*B. prodigiosus*); verde o azul (*B. piociánico*); violeta (*B. violaceus*), etc.

INVESTIGACIONES DE LAS PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS DE LOS MICROBIOS

Los productos formados en los cultivos varían cualitativa y cuantitativamente según la especie microbiana que se desarrolla, lo cual permite caracterizarla. Es importante conocer, para la determinación de los gérmenes, los procedimientos de laboratorio más importantes y usuales en la investigación de tales productos. Estas investigaciones, a su vez, nos señalan las propiedades bio - químicas de los microorganismos.

PROPIEDADES SACAROLÍTICAS:

Acidificación del medio.—

a) *Acción sobre el carbonato de calcio:*

Los medios líquidos azucarados adicionados de 2 por ciento de carbonato de calcio evidencian la fermentación de azúcar cuando el germen sembrado, al producir los ácidos, produce burbujas gaseosas. Este es el procedimiento más antiguo, poco usado actualmente, porque la formación de burbujas es a veces fugaz y el fenómeno puede pasar desapercibido.

b) *Caldo tornasolado azucarado:*

El caldo azucarado y con tintura de tornasol vira al rojo cuando el microbio sembrado produce ácido por fermentación del azúcar.

c) *Agar tornasolado azucarado:*

Se siembran los gérmenes en tubos en estría o placas de Petri con agar azucarado y tintura de tornasol. Si hay fermentación del azúcar el color azul vira al rojo por la producción de ácido.

Producción de gas.—

La fermentación de los azúcares por los microbios se efectúa con o sin producción de gas. La comprobación del fenómeno constituye un dato importante para el diagnóstico.

a) *Siembra en agar profundo:*

La siembra en un tubo de agar profundo azucarado nos revela la formación de gas por la fragmentación del medio.

b) *Método del tubo en campana:*

Consiste en sembrar los gérmenes en un tubo de caldo azucarado que lleva en su interior un tubito invertido y lleno de caldo. Si el germen sembrado en este medio produce gas, una parte de éste se colectará en el tubito en campana y el mayor o menor desplazamiento del caldo del interior registrará el poder fermentativo del germen.

ACCIÓN SOBRE LA LECHE:

Los cultivos en leche pura o leche tornasolada pueden presentar los siguientes caracteres:

1º *No hay desarrollo microbiano.*

2º *Hay desarrollo de gérmenes sin alteración del medio.*

3º *Se produce la coagulación de la leche:*

a) *En medio ácido* por fermentación de la lactosa y producción de ácido láctico que precipita la caseína, y

b) *En medio alcalino* por gérmenes que no atacan la lactosa pero que producen fermento lab, quimosina o cuajo. En ambos casos el coágulo puede presentar aspectos diferentes (compacto, liso, esponjoso, etc.).

4º *El coágulo no presenta alteraciones:*

5º *El coágulo puede ser digerido* si el microbio genera diastatas proteolíticas específicas para la caseína.

Si se usa la leche tornasolada el color azul amatista del medio vira al rojo cuando hay producción de ácidos, no se altera cuando la reacción permanece neutra o alcalina y se decolora totalmente cuando el germen tiene propiedades reductoras.

ACCIÓN REDUCTORA:

a) *Investigación del H₂S:*

Agregar a un tubo de agar licuado por el calor una gota de solución recién esterilizada de:

Subacetato de plomo liq. de Codex..... 1 c.c.
Agua destilada 9 c.c.

Mezclar rápidamente haciendo girar el tubo entre las manos. Enfriar rápidamente. Se obtiene un medio sólido de color blanquizco. Se siembra por picadura profunda en varios puntos entre el vidrio y el agar. Si hay producción de H₂S, el medio toma un tinte negro más o menos marcado (sulfuro de plomo). Prácticamente se dice que un germen ennegrece o no el agar-plomo. (Medio diferencial).

b) *Medios líquidos coloreados:*

Se preparan tubos de agua peptonada con algunas gotas de tintura de tornasol, solución de rojo neutro al 1 por ciento o azul de metileno al 2 por ciento. Sembrar. Observar los tubos entre 24 y 48 horas. La reducción (decoloración), comienza por la profundidad y gana progresivamente las capas superficiales. La agitación del tubo regenera la coloración de tornasol y azul de metileno (pero no el rojo neutro) por oxidación al poner el medio en contacto del aire.

La acción reductora puede investigarse también en leche adicionada de las mismas sustancias colorantes: la reducción se manifiesta por la decoloración total o parcial del medio.

Besson ha aplicado estos principios a la preparación de un medio de cultivo muy útil para la determinación rápida de los microbios patógenos del intestino. Es el tubo B. que contiene caldo glucosado adicionado de rojo neutro y con tubitos de hemolisis invertidos (tubos en campana). Después de 24 horas de cul-

tivo los tubos sembrados permiten apreciar: 1º Los fenómenos de reducción del rojo neutro (decoloración y fluorescencia); 2º Acidificación (color amaranto), o alcalinización (color rojo amarillento) del medio; 3º Producción o no de gas por fermentación de la glucosa, y su cantidad observable en los tubitos invertidos. Para facilitar citaremos algunos ejemplos típicos: Bacilo tífico y disentéricos: tinte amaranto (acidez); no gas. Paratífico A.: tinte amaranto (acidez); gran burbuja de gas. Paratífico B.: fluorescencia (reducción); mitad del tubito con gas. Colibacilo: fluorescencia y color amarillo anaranjado (reducción); mucho gas.

ACCIÓN PROTEOLÍTICA:

a) *Producción de Indol:*

Se demuestra por la *Reacción del Nitroprusiato (R. de Weil - Legal)*.

A un cultivo de 24 a 48 horas en agua peptonada, agregar: 10 gotas de nitroprusiato de sodio al 5 por ciento, 10 gotas de solución de soda al 30% y 5 gotas de ácido acético cristalizante. La reacción positiva se manifiesta por una coloración azul.

b) *Acción sobre el suero coagulado:*

Cuando el germen tiene acción proteolítica produce la licuación del medio que comienza con la formación de depresiones en cúpula alrededor de las colonias.

c) *Acción sobre la albúmina de huevo:*

En un tubo de caldo colocar un pequeño cubo de clara de huevo coagulada por el calor. Esterilizar al autoclave. El desarrollo de los microbios proteolíticos da lugar a la disolución más o menos rápida del cubo. Igual fenómeno puede producirse empleando en lugar de cubos de clara de huevo, trozos de carne (caldo carne).

d) *Acción sobre la gelatina:*

Sembrar en superficie (Placa de Petri) o en profundidad (picadura en tubo). Mantener a la temperatura ordinaria y observar la aparición de la licuación y sus modalidades (cúpula, embudo, etc.). Para un diagnóstico rápido y con gérmenes que no se desarrollan bien a la temperatura ordinaria es recomendable dejar los tubos de cultivo a la estufa y a las 24 horas enfriarlos (heladera); si persiste el estado líquido, significa que ha habido fermentos proteolíticos.

CAPITULO IX

FACTORES CELULARES DE DEFENSA

FAGOCITOSIS

DEFINICIÓN. — *Facultad que poseen ciertos elementos celulares, fijos o móviles, de adherir determinadas partículas orgánicas o inorgánicas, englobarlas y digerirlas.*

El aparato fagocitario en los animales superiores está constituido exclusivamente por elementos celulares de origen mesodérmico que pueden ser *móviles* o *inmóviles*.

a) Elementos móviles:

Están representados principalmente por los leucocitos, de los cuales gozan de propiedades fagocitarias los polinucleares neutrófilos (**micrófagos**) y los monocitos (**macrófagos**). No participan en la fagocitosis: los linfocitos, entre los mononucleares, y los basófilos, entre los polinucleares (granulocitos). Es discutida la acción fagocitaria de los eosinófilos.

b) Elementos inmóviles o fijos:

En los distintos órganos y tejidos existen elementos dotados de propiedades fagocitarias.

a) Las *células reticulares* de la pulpa esplénica, de los folículos y de los cordones linfáticos, de los ganglios y otros tejidos linfoides.

b) Las *células endoteliales* de los senos de los ganglios linfáticos, las del endotelio de los capilares venosos del bazo y de la médula ósea; además, las células endoteliales de todos los órganos caracterizados por la posesión de sinuosidades (células de Kupffer del hígado, células endoteliales de las suprarrenales e hipófisis).

c) Los *histiocitos* (clasmatocitos de Ranvier) o células móviles del tejido conjuntivo, las células embrionarias de la piel.

d) Los *esplenocitos* que constituyen macrófagos activos, especialmente para los glóbulos rojos.

Los monocitos se consideran como elementos originados de las células fagocitarias fijas.

SISTEMA RETICULO - ENDOTELIAL (S. R. E.)

El S. R. E. está constituido por ciertos elementos móviles e inmóviles del aparato fagocitario que tienen fuera de su origen mesenquimático, propiedades fisiológicas comunes cuya manifestación más aparente es la **cromofilia** o **granulopexia**. Efectivamente, si se inyecta a un animal ciertos colorantes y sustancias al estado coloidal, (litio - carmín, pirrol, azul - tripán, tinta china, etc.) y se sacrifica posteriormente, se observa su fijación (**pexia**) en diversos elementos celulares fijos y móviles que constituyen en su conjunto el S. R. E.

Sin embargo, no todas las sustancias coloidales son fijadas por el S. R. E. Se ha demostrado, en efecto, que su carga eléctrica juega un papel esencial. En el organismo los cuerpos que se fijan en el S. R. E. se comportan como coloides electro negativos. La coloidopexia se hace al nivel del S. R. E. como si los elementos de este representaran el anodo natural del organismo (Du Bois).

El conjunto de elementos celulares caracterizados por la propiedad fagocitaria (polinucleares y S. R. E.), había sido descrito ya por Metchnikoff bajo la denominación de **micrófagos** y **macrófagos**.

Actualmente, Aschoff ha establecido que el S. R. E. está compuesto fundamentalmente por: los endotelios de los vasos sanguíneos y linfáticos; los fibrocitos o células ordinarias del tejido conjuntivo; las células reticulares de la pulpa esplénica, de los ganglios linfáticos y de los tejidos linfáticos en general; las células reticulo - endoteliales de los senos de los ganglios linfáticos, de los senos san-

guíneos del bazo, de los capilares de los lóbulos hepáticos, (células de Kupffer), de los capilares de la médula ósea, de las suprarenales, de la hipófisis; los histiocitos; los esplenocitos y los monocitos.

MECANISMO DE LA FAGOCITOSIS

Se verifica en tres etapas:

I.—*Fijación o pexia*. — En este período se produce el contacto adhesivo entre las células fagocitarias y sustancias múltiples (elementos no microbianos como el carmín, el azul de pirrol, la tinta china, metales coloidales, partículas inertes de toda especie y elementos microbianos). Este fenómeno se produce aún con leucocitos muertos y depende exclusivamente de las condiciones físicas de las células y de las partículas (tensión superficial y viscosidad). Cuando la fijación se hace con elementos microbianos se habla de **propiedad bacteriopéxica de las células**. Así, por ejemplo, se ha visto que los bacilos de Koch a los pocos minutos de ser inoculados en la sangre son fijados y englobados por los endotelios sinusoidales del bazo y por las células estrelladas de Kupffer.

II.—*Englobamiento*. — La adhesión es seguida del englobamiento que se produce gracias a un solevantamiento del protoplasma que aprisiona la partícula en contacto. El englobamiento puede hacerse también por penetración simple o hundimiento del cuerpo extraño en el citoplasma celular. Este fenómeno se efectúa exclusivamente con células fagocitarias vivas aunque las condiciones físicas desempeñan un papel de capital importancia.

III.—*Digestión*. — La última etapa de la fagocitosis es la digestión, que se verifica con la formación previa de una vacuola en la cual se vierten los distintos fermentos: de oxidación y reducción, de hidratación y deshidratación (proteasas, lipasas y amilasas) y de coagulación. No siempre hay digestión del germen englobado, el cual, conservando su vitalidad, puede ser transportado a distancia del punto de penetración y determinar así nuevos focos de infección, (gonococo y meningococo).

EXPERIENCIAS SOBRE FAGOCITOSIS

a) *Microfagocitosis*:

1.—Inyéctese por vía intraperitoneal a un cuy de 400 grs. 1 c. c. de cultivo de 24 horas en caldo glucosado de *Streptococcus* de virulencia mediana. Después de 18 horas estúdiense el exudado peritoneal teñido con azul de metileno.

2.—Inocúlese en el saco linfático dorsal de una rana 2 c.c. de un cultivo de 24 horas en caldo peptonado de bacteridia carbuncosa. Estúdiense el exudado obtenido por punción cada hora.

b) *Macrofagocitosis*:

Prepárese una suspensión de eritrocitos lavados de paloma al 5 por ciento. Inocúlese un cuy con 3 c.c. de esta suspensión por vía intraperitoneal. Después de tres horas estúdiense el exudado peritoneal obtenido por punción por el método de coloración de May - Grunwald — Giemsa o Policromo de Unna.

3.—Se extraen 5 c.c. de sangre humana por medio de una jeringa estéril lubricada, en su interior con vaselina también estéril. En seguida se coloca esta sangre en una placa de vidrio revestida interiormente de una capa delgada de parafina sólida (para evitar la coagulación) y en la cual se ha colocado de antemano una emulsión concentrada del germen con el cual se desea trabajar. Previa agitación suave, se coloca la placa a la estufa cada 5 minutos hasta enterar media hora. Se hacen frotis con la sangre y se tiñen sea con Gram (gérmenes corrientes) o Ziehl - Nielsen (bacilos de Koch). Procediendo así, es posible observar desde los primeros frotis, el englobamiento de los gérmenes que en los últimos aparecen ya fagocitados.

4.—Colóquese una gota de sangre en la excavación de una lámina excavada tal como se usa para la gota colgante. Cúbrase con una laminilla limpia, cerrando los bordes con vaselina y colóquese en una placa de Petri grande que contiene pedazos de papel filtro humedecidos con agua (cámara húmeda). Colocar a la estufa durante 15 minutos.

Sáquese el cubre objeto o laminilla y lávese cuidadosamente con solución salina normal. Repítase la misma operación con la lámina. Los eritrocitos son arrastrados y los leucocitos quedan adheridos a la lámina y laminilla. En seguida llenar la excavación con suero fresco y agregar un asa de un cultivo en caldo de 24 horas de bacilo carbuncoso no virulento. Aplicar la laminilla y colocar vaselina en las márgenes para evitar la evaporación. Si es posible usar platina calentable y observar el proceso bajo el microscopio.

Observar si hay fagocitosis y qué células actúan como fagocitos, como asimismo las fases de fijación, de englobamiento y de digestión.

c) *Autofagia*:

Es fácil estudiar la autofagia fagocitaria en el exudado peritoneal de cuy. Inocular por vía peritoneal una emulsión microbiana cualquiera. Se comprueba primero la aparición de polinucleares y más tarde, (9 a 14 horas), la llegada de los mononucleares grandes y con ello comienza la autofagia (destrucción de los microfagos por los mononucleares grandes), que puede durar de 1 a 3 días.

CAPITULO X

FACTORES HUMORALES

PODERES ANTITOXICO, PRECIPITANTE Y AGLUTINANTE

Los sueros de los animales preparados o inmunizados adquieren substancias o propiedades nuevas, denominadas *anticuerpos*, que reaccionan específicamente con el antígeno correspondiente. Los anticuerpos principales y más importantes son: *antitoxinas*, *precipitinas*, *aglutininas*, *lisinas* (*bacterio y citolisinas*), *opsoninas*, etc. Los consideraremos separadamente.

PODER ANTITÓXICO

DEFINICIÓN. — *Propiedad que tienen los sueros de los animales inmunizados de neutralizar específicamente las toxinas, en la reacción antígeno - anticuerpo.*

Las antitoxinas se ponen en evidencia de la manera siguiente:

a) Poniendo en contacto la toxina con el suero antitóxico (*neutralización "in vitro"*). La inoculación de esta mezcla es inofensiva para el animal sensible.

b) Inyectando previamente al animal una dosis de suero antitóxico y algunas horas después dosis mortales de toxina (*neutralización "in vivo"*). El animal sobrevive.

c) Por la *reacción de floculación*. Una toxina puesta en presencia de la antitoxina respectiva produce una reacción de precipitación en determinadas condiciones. En una serie de mezclas de toxina - antitoxina en las cuales la antitoxina se halla en cantidades crecientes, la neutralización absoluta de la toxina se encontrará en el primer tubo en que parece la floculación (Ramón). El poder floculante de la toxina se lo designa por L. F., que sería la cantidad de toxina que mezclada a una unidad antitóxica provoca la floculación.

Estos tres métodos se emplean en los distintos laboratorios que preparan sueros terapéuticos en la titulación de la toxina y de la antitoxina (D. M. M. y U. A.; Dosis Mínima Mortal y Unidad Antitóxica). *

No todos los organismos tienen idéntica aptitud en la producción de antitoxinas. En los sujetos nuevos precisarán varias inyecciones de antígeno para obtener un título determinado. En cambio, en los organismos inmunizados (inmunización por contacto u oculta, por vacunación, por infección clínica, etc.), la inyección de antígeno determina una producción rápida e intensa de antitoxina ("reactivación").

Según la relación y tiempo empleado en las inyecciones es posible estudiar en los animales el poder preventivo y el poder curativo que en este caso especial constituye un ejemplo de un anticuerpo que es testigo de inmunidad a la par que de infección.

PODER PRECIPITANTE.—FLOCULACION

DEFINICIÓN. — *La precipitación o floculación es la condensación en grumos de micelas coloidales en la reacción antígeno - anticuerpo.*

Hoy día se tiende más a aceptar el término de *floculación* que recuerda el origen coloidal del fenómeno, que el de *precipitación* que sugiere un proceso netamente químico.

Las precipitinas se ponen en evidencia mezclando "in vitro" en proporciones convenientes el "antisuero" con el "antígeno" respectivo, haciéndose visible la floculación al poco tiempo, especialmente a la temperatura de 37 grados.

* Es frecuente la designación de la Dosis Mortal Mínima por D. L. M. (Dosis Letal Mínima).

Es posible evidenciar el fenómeno con un filtrado de cultivo en caldo de bacilo tífico (2 a 3 c.c.) y unas cuantas gotas de suero antitífico. Aparece un enturbiamiento, más tarde flóculos que al precipitarse al fondo del tubo, dejan límpido el líquido restante. Si repetimos la experiencia con el mismo filtrado pero agregándole algunas gotas de suero normal, no se produce ningún enturbiamiento: no hay floculación.

La reacción tipo de precipitación se denomina también **Reacción de Kraus**.

Precipitinas y aglutininas. — Se ha pretendido identificar ambos anticuerpos. Un suero aglutinante es, en general, precipitante, pero un suero precipitante no es siempre y fatalmente aglutinante. La saturación de la precipitina no disminuye el poder aglutinante. Sin embargo, la absorción de aglutininas hace desaparecer el poder precipitante.

Suele, a veces, un antígeno provocar la formación de precipitinas que no sólo reaccionan específicamente con él, sino que también, con antígenos de especies vecinas (coprecipitinas). Así, por ejemplo, si inoculamos un cordero con suero de conejo, veremos que el anticuerpo formado en el cordero precipita no sólo el suero del conejo, sino también al suero del cuy.

Tiene importancia en la reacción de floculación las proporciones relativas del antígeno y del anticuerpo y la presencia de un electrolito. Un exceso de uno o de otro de los reactivos puede inhibir la floculación (**fenómeno de zona**). Este fenómeno ha sido utilizado en los últimos años para la titulación de los sueros antitóxicos y de las toxinas. El poder floculante no exige la presencia de "alexina" o "complemento".

Las aplicaciones de la floculación son numerosas en Medicina. En bacteriología, conjuntamente con las aglutininas, se utilizan las precipitinas para la investigación de las especies microbianas y para el diagnóstico de las infecciones (**Reacción de Ascoli** para el carbunco; **Reacción de Kahn** para la sífilis). También se puede identificar sustancias proteicas, (**Reacción de Uhlenhuth** para las manchas de sangre en Medicina Legal).

Fenómeno estudiado por primera vez por Bordet al observar la acción del suero anticolérico sobre el Vibrión colérico de Koch.

DEFINICIÓN. — *La aglutinación es la conglomeración de elementos figurados (gérmenes o células) en la reacción antígeno anticuerpo.*

Es un fenómeno físico-químico que se efectúa aún cuando los elementos figurados sean microbios muertos. Las aglutininas se ponen fácilmente en evidencia poniendo en presencia el antígeno, representado por elementos figurados (emulsión microbiana o glóbulos rojos) y el anticuerpo correspondiente (suero de los animales preparados). Así, por ejemplo, si a un cultivo o a una emulsión homogénea de bacilos de Eberth dejamos caer unas cuantas gotas de suero aglutinante antitífico, observaremos al poco tiempo, ya sea a la temperatura ordinaria, o mejor a 37 grados, la formación de grumos que tienden a sedimentarse. Si este mismo fenómeno que observamos a simple vista (**procedimiento macroscópico**) lo seguimos al microscopio, veremos que el bacilo de Eberth comienza por perder su movilidad (primer tiempo) y tiende, secundariamente, a agruparse en conglomerados de un gran número de microbios (segundo tiempo).

El fenómeno se mide buscando cuál es la más pequeña cantidad de suero que puede determinar la aglutinación (suero aglutinante al 1/10 - 1/100 - 1/1000, etc.).

Así como hay coprecipitinas, existen **coaglutininas** o **aglutininas de grupo**. Así, por ejemplo, un suero anti-Eberth puede aglutinar al bacilo paratífico A con menor intensidad que al bacilo de Eberth. La **Prueba de Castellani (saturación de las aglutininas)**, permite poner en evidencia estas aglutininas de grupo o coaglutininas.

PRUEBA DE SATURACION DE CASTELLANI.

El frecuente hallazgo de las coaglutininas o aglutininas de grupo en el suero proveniente de casos de enfermedades infecciosas, requiere precisar si tal aglutinación contemporánea para varias cepas de gérmenes corresponde a una aglutinación secun-

daria o bien a una infección mixta. Se recurre al método de Castellani o de saturación de las aglutininas inspirado en el siguiente principio científico:

a) Un suero aglutinante saturado con la cepa bacteriana homóloga pierde totalmente su actividad frente a toda otra especie microbiana. En cambio el contacto o saturación con la especie bacteriana heteróloga que provoca la coagulación, hace perder su poder aglutinante sólo para tal especie conservándolo, en cambio, para la cepa homóloga.

b) El suero de un individuo en curso de una infección provocada por dos especies microbianas ("infección mixta") y tratado con una sola de estas especies, pierde el poder aglutinante sólo para ella y no para la otra especie.

Técnica de la Reacción de Castellani.

Supongamos que el suero en estudio aglutine tanto al B. tífico como al B. paratífico A. Se emplean dos tubos (1 - 2) y se agrega a cada uno un c.c. de suero. En el tubo 1, se agrega una o dos gotas de emulsión de B. tífico; en el segundo tubo la misma cantidad de B. paratífico A. Se colocan ambos tubos en la estufa de cultivo por espacio de 12 horas. Se procede después a separar mediante centrifugación el suero del material microbiano aglutinado y se procede a provocar la aglutinación de la especie no empleada en la saturación descrita, es decir, en el tubo N° 1 se pondrá B. paratífico A. y en el segundo tubo B. tífico. Si en esta prueba resultare que frente al B. paratífico A. la actividad del suero permanece inalterada a pesar de la saturación con el B. tífico, o bien, que la actividad frente al B. tífico subsiste aún a pesar de la absorción de las aglutininas con el B. paratífico A., se podrá deducir que se trata de una infección tifoidea a B. de Eberth, y deberemos interpretar como aglutinación de grupo la verificada anteriormente para el paratífico A.

Las aglutininas se utilizan en el diagnóstico de ciertas enfermedades infecciosas (**Reacción de Widal** para la fiebre tifoidea; **Reacción Weil-Félix**, para el tifus exantemático) y para la determinación o identificación de especies o razas microbianas, (grupos I, II o III de neumococos).

La producción de aglutininas se halla ligada a la penetración natural o artificial del antígeno en el organismo y no a la inmunidad. En un convaleciente de fiebre tifoidea y con presencia abundante de aglutinina anti-Eberth es posible, sin embargo, la recaída o recidiva. La reacción aglutinante no es una reacción de inmunidad, sino una reacción de infección.

Obtención de las aglutininas. — Se obtiene fácilmente la producción de aglutininas específicas inyectando a un animal dosis crecientes de un cultivo microbiano ya sea por vía subcutánea peritoneal o intravenosa. Esta última es la preferida.

El poder aglutinante no aparece, en general, sino diez o quince días después de la primera inoculación; aumenta a medida que se repiten las inyecciones sufriendo, eso sí, y al igual que los demás anticuerpos, un descenso inmediato a la penetración del antígeno.

Las aglutininas es posible obtenerlas con gérmenes vivos o muertos.

CARACTERES GENERALES.—Son "termoestables": resisten un calentamiento de 55 grados y sólo son destruidas a 70 grados. Manifiestan de preferencia su acción a 37 grados. Resisten la desecación y la putrefacción.

La presencia de un electrolito (cloruro de sodio), es indispensable en la producción del fenómeno.

En el organismo vivo se hallan, además de la sangre, en ciertos humores (leche, humor acuoso, parte líquida del pus, orina, serosidad pleural y pericardiaca). Por el contrario no pasan a la saliva ni al líquido cefaloraquídeo, pudiendo, sin embargo, hallárselas en el feto, gracias a la permeabilidad placentaria a los anticuerpos en general.

Aglutininas normales.

Ciertos sueros normales tienen capacidad aglutinante, siempre débil, para determinadas especies microbianas. Este hecho tiene su importancia práctica en la interpretación de las reacciones corrientes de diagnóstico bacteriológico de las infecciones.

El suero normal de caballo aglutina el B. coli y el B. tetánico. El suero humano es, a veces, aglutinante a título 1/10 - 1/20 para el B. Eberth; con frecuencia para algunas cepas de colibacilos, B. Flexner, M. Melitensis.

EXPERIENCIAS

Neutralización de la toxina:

1.—Inyectar por vía endovenosa 2 c.c. de toxina histolítica a un conejo. Observar la rápida muerte del animal.

2.—Mezclar 1 c.c. de toxina con antitoxina en la cantidad necesaria para neutralizarla. Incubar media hora a 37 grados (fijación). Inyectar la mezcla por vía endovenosa a un segundo conejo. Observar la supervivencia del animal.

Precipitación "in vitro":

En un tubo de hemolisis colocar una toxina (toxina diftérica). Agregar lentamente la antitoxina respectiva (suero antidiftérico). Observar el fenómeno de floculación.

Aglutinación "in vivo":

a) Cultivar en un medio líquido apropiado el Tipo I de neumococo durante 24 horas. Centrifugar totalmente 200 c.c. y suspender los cocci en 10 c.c. de suero fisiológico, tratando de obtener una suspensión libre de grumos.

b) Inyectar 5 c.c. de esta suspensión intravenosa a un conejo.

c) Extraer inmediatamente un poco de sangre del corazón y hacer frotis. Sacar nuevamente muestras 5, 10 y 15 minutos después y preparar frotis. Colocar para el examen de los neumococos.

d) Inyectar 5 c.c. de la suspensión en un segundo conejo e inmediatamente después 2 c.c. de suero antineumónico Tipo I; ambas inyecciones por vía intravenosa.

e) Inmediatamente extraer sangre del corazón (en menos de 1 minuto de la inyección del suero) y hacer preparaciones. Repetir 2, 3, 5, 10 y 15 minutos después. Colorear y examinar las preparaciones.

¿Hay evidencia de aglutinación en la sangre del segundo conejo? ¿Hay evidencia de fagocitosis? Discutir la relación de la inmunidad con las aglutininas.

Aglutinación "in vitro":

Exp. 1. — En un tubo de ensayo colocar 1 c.c. de una emulsión homogénea de bacilos de Eberth (vivos o muertos). Agregar a esta emulsión de antígeno el anticuerpo representado por el suero aglutinante anti-Eberth. Observar el fenómeno macro y microscópicamente.

Exp. 2. — Influencia de los electrolitos:

a) A una emulsión de bacilos tíficos agregar en partes iguales una dilución de suero anti-Eberth. Incubar una hora a 37 grados (fijación). Centrifugar.

b) Botar el líquido que sobrenada y emulsionar el centrifugado en agua destilada, destruyendo los grumos por agitación.

c) En tubos de hemolisis colocar:

1) 1 c.c. de la emulsión + 1 c.c. de agua destilada.

2) 1 c.c. de la emulsión + 0,9 c.c. de agua destilada + 0,1 de suero fisiológico al 10 por ciento.

3) 1 c.c. de la emulsión + 0,9 de agua destilada + 0,1 de una solución al 2 por mil de sulfato de cobre.

Incubar a 37 grados durante una hora.

Investigar en qué tubos se ha producido la aglutinación y cuál es la influencia de los electrolitos en el fenómeno.

CAPITULO XI

FACTORES HUMORALES

PODER LITICO (BACTERIOLISIS Y CITOLISIS)

DEFINICIÓN. — *Es la propiedad que tienen los sueros de los animales preparados de disolver los elementos figurados (gérmenes o glóbulos rojos) en la reacción antígeno - anticuerpo.*

Así, por ejemplo, en el **fenómeno de Pfeiffer** se observa la propiedad que adquiere el suero de los cuyes vecunados con vibriones coléricos de transformar estos gérmenes en gránulos y de lisarlos totalmente cuando son puestos en su presencia. El suero de estos animales así preparados contiene **bacteriolisinas** (anticuerpo) capaces de lisar específicamente a los vibriones coléricos (antígeno). Idéntico fenómeno se observa si a un conejo le inoculamos en serie glóbulos rojos de cordero. El suero de ese conejo adquiere la propiedad de disolver específicamente los hematíes de cordero. El anticuerpo se llama, en este caso, **hemolisina**.

La hemolisis puede ser producida por diversos agentes *no específicos* físicos y químicos que actúan igualmente sobre los eritrocitos de un gran número de animales y agentes *específicos* que actúan sobre los eritrocitos de una sola especie animal.

Estas sustancias pueden agruparse en la forma siguiente:

- | | | |
|-----------------------------|---|---|
| Hemolisis
no específica: | } | 1 <i>Agitación mecánica.</i> |
| | | 2 <i>Cambios de temperatura</i> (calor: alternativas de congelación y deshielo). |
| | | 3 <i>Agua: soluciones salinas hipotónicas e hipertónicas.</i> |
| | | 4 <i>Acidos, sales y otras sustancias químicas.</i> |
| | | 5 <i>Extractos de tejidos</i> (productos autolíticos). |
| | | 6 <i>Coloides inorgánicos</i> (ácido silícico). |
| | | 7 <i>Substancias foto-dinámicas</i> (tintas, etc.) |
| | | 8 <i>Venenos vegetales</i> (ricina, abrina, crotina, saponina). |
| | | 9 <i>Venenos bacterianos</i> (tetanolisina; estreptolisina; estafilolisina, etc.) |
| | | 10 <i>Secreciones animales</i> (veneno de arañas, veneno de cobra, etc.) |

- | | | |
|--------------------------|---|---|
| Hemolisis
específica: | } | 1 <i>Hemolisinas naturales del suero.</i> |
| | | 2 <i>Hemolisinas de sueros inmunes.</i> |

MECANISMO DE LA LISIS

Estos fenómenos de cito y bacteriolisis se ponen en evidencia siempre que en esta reacción antígeno - anticuerpo se hallen presentes tres elementos:

I.—El *antígeno* (hematíes, gérmenes, etc.).

II.—La *alexina* o *complemento*, que existe normalmente en el suero fresco de todos los animales, (desaparece con el envejecimiento), es termolábil (se destruye a 55 grados) y no específico.

III.—La *sensibilizadora* o anticuerpo específico que existe únicamente en el suero de los animales preparados por inoculaciones previas del antígeno, es termoestable (no se destruye a 55 grados) y se fija específicamente en el antígeno haciéndolo sensible a la acción de la "alexina" o complemento.

Los microbios o las células sensibilizados conservan por fijación la sensibilizadora: si se los desembaraza por lavados sucesivos y centrifugación del suero sensibilizado en el cual se hallan

en suspensión, conservan, a pesar de todo, la propiedad de ser destruidos si se los pone en contacto con la alexina. Según Bordet, desempeñaría el mismo papel de los "mordientes" que preparan las células de los tejidos a la acción de las materias colorantes.

Las tres experiencias siguientes permiten precisar estos conceptos:

I.—Gl. rojos de cordero + suero normal (alexina o complemento). = No hay hemolisis.

II.—Gl. rojos de cordero + suero anti-cordero calentado a 55 grados. = No hay hemolisis.

III.—Gl. rojos de cordero + suero anti-cordero calentado a 55 grados + suero fresco normal (alexina o complemento). = Hay hemolisis.

FIJACIÓN DE LA ALEXINA O DESVIACIÓN DEL COMPLEMENTO (Reacción de Bordet - Gengou)

En vista de que los antígenos lisables son relativamente escasos, (glóbulos rojos y una que otra especie microbiana), Bordet y Gengou se han valido de un artificio para poner en evidencia el anticuerpo específico (sensibilizadora) en un suero determinado.

La reacción de Bordet - Gengou tiene la siguiente técnica general: Tomaremos como ejemplo el diagnóstico de la disentería bacilar. En un tubo de hemolisis se vierte:

1.—Suero anti-disentérico calentado a 55 grados, 1/2 hora, (sensibilizadora).

2.—Una emulsión de bacilos disentéricos (antígeno).

3.—Algunas gotas de suero normal no calentado (alexina o complemento). Ponemos esta mezcla a 37 grados una hora (en la estufa o al baño maría). Durante este tiempo el antígeno (bacilo disentérico) sensibilizado por el anti-suero correspondiente (sensibilizadora) fija la alexina. En un segundo tiempo a la mezcla anterior agregamos al **sistema hemolítico**: glóbulos rojos de cordero + suero anti-cordero (calentado a 55 grados o envejecido). Como la alexina o complemento ha sido ya fijada por el primer sistema (bacilo disentérico + suero anti-disentérico), no se produce hemolisis por estar incompleto el sistema hemolítico. Ahora bien, si en el primer tiempo usamos un suero que no contiene sensibilizadora disentérica, por ejemplo, normal, el complemento o alexina

xina quedará libre y se desviará y se fijará en el sistema hemolítico produciéndose la hemolisis.

La reacción de Bordet - Gengou es positiva cuando no hay hemolisis y es negativa en el caso contrario.

Preparación del material.

1.—*Suero en estudio.* — Puede ser el suero de un animal vacunado o bien de un enfermo en el cual se sospecha la existencia del anticuerpo específico ("sensibilizatriz"). Se calienta al baño - maría durante $\frac{1}{2}$ hora a 55° para destruirle la alexina o complemento, temperatura que en cambio deja intacta la sensibilizatriz si existe.

2.—*Antígeno.* — El antígeno varía según la investigación que se pretenda hacer y puede ser microbiano o emulsión de órgano (hígado heredo - sifilítico, por ejemplo), o bien un simple antígeno coloidal (lipoides).

3.—*Alexina o complemento.* — Está representado por el suero fresco de un animal nuevo. Es preferible el cuy, tanto por la facilidad de extraer la sangre por punción cardíaca, cuanto porque posee la alexina que representa menos variaciones comparadas con la de los otros animales. (Se recomienda no usar cuyes hembras, pues cuando están preñadas tienen poca alexina).

4.—*Sistema hemolítico, que comprende:*

a) *Suero hemolítico anti - cordero,* que se prepara inyectando, por ejemplo, 6 a 8 c.c. de sangre defibrinada de cordero en el peritoneo de un conejo. Se repiten estas inoculaciones 3 veces con intervalo de 8 días. Ocho o diez días después de la última inyección se extrae la sangre de conejo por punción de la vena marginal de la oreja, de la yugular o de la carótida. Después de la coagulación se decanta el suero obtenido y se calienta a 55° durante $\frac{1}{2}$ hora, para privarlo de su propia alexina.

b) *Glóbulos rojos de cordero.* — La sangre de cordero se obtiene por punción de la vena yugular, (en la práctica se aprovechan los animales del matadero). Se utiliza un matraz estéril con perlas de vidrio para defibrinarla por agitación. Se centrifuga y se lava repetidas veces con suero fisiológico estéril. Después de la última centrifugación se emulsionan los hematíes en un volumen de suero fisiológico hasta reconstituir el volumen primitivo de la sangre total.

Nota: La mayoría de los elementos precedentes deben estar previamente titulados, pues si no la reacción dejaría de tener valor.

Aplicaciones prácticas de la reacción de Bordet - Gengou.

Se utiliza:

1.—*En el diagnóstico de las enfermedades infecciosas* sífilis (**Reacción de Wassermann**), tuberculosis (**Reacción de Besredka**), quiste hidático (**Reacción de Weinberg**), blenorragia (**Gonoreacción**), brucelosis, fiebre tifoidea, etc., etc.

2.—*Para la identificación de especies microbianas.* Partiendo de un antisuero conocido se puede identificar el antígeno específico (especie o raza microbiana desconocida).

EXPERIENCIAS

I.—*Hemolisis no específica:*

Resistencia de los glóbulos rojos a las soluciones salinas a diferentes concentraciones.

1.—Colocar glóbulos rojos humanos y de cordero en agua destilada y en soluciones salinas a diferente concentración variando desde un 3 o/oo a un 19 o/oo. Observar en qué tubos se produce hemolisis.

2.—En una serie de tubos de ensaye colocar sangre citratada humana o de cordero y agregar una solución de saponina Merk al 1 por mil, recién preparada. Observar la hemolisis.

3.—Idem, agregando soluciones crecientes de ácido y de álcalis.

II.—*Hemolisis específica:*

Las experiencias de este tipo están consignadas en la parte descriptiva de la presente clase práctica.

III.—*Especificidad de la hemolisina:*

Emplear hemolisina anti - cordero y anti - humana y observar si hay hemolisis cruzada con glóbulos rojos de cordero y humanos.

IV.—*Hemolisis microbiana:*

Observar cultivos de Estreptococos o Estafilococos dotados en caldo y medios sólidos adicionados de glóbulos rojos.

CAPITULO XII

LA HEMOAGLUTINACION

GRUPOS SANGUÍNEOS

El concepto moderno de grupos sanguíneos es la consecuencia del descubrimiento de las aglutininas y lisinas, anticuerpos de los sueros normales. Su fundamento biológico se deduce del estudio de los fenómenos de **heteroaglutinación**, es decir, la aglutinación producida por un suero sobre glóbulos rojos de un individuo de diferente especie: de **isoaglutinación** con suero y hematíes de individuos de la misma especie: **autoaglutinación** cuando son del mismo individuo.

La experimentación ha demostrado que los hematíes de un individuo dado quedan en suspensión homogénea, "in vitro", en presencia del suero del mismo individuo: (la autoaglutinación y la autohemólisis son muy raras y constituyen un fenómeno patológico, como sucede en la hemoglobinuria paroxística). Existe, en cambio, isoaglutinación (aglutinación de los glóbulos rojos de un individuo por el suero de otro) como hecho fijo, inmutable, específico y constitucional.

El estudio de estos fenómenos en el hombre condujo a Landsteiner a demostrar que ellos se presentaban en estado normal, fisiológico y eran, por lo tanto, independientes de cuadros patológicos. A partir de estas observaciones se tentó la clasificación de los sueros de los diferentes individuos en los que llamamos hoy los grupos sanguíneos y a través de varias clasificaciones se llegó a la de Moss, que es universalmente aceptada.

Moss ha demostrado que los seres humanos se dividen en 4 grupos cuyos caracteres describiremos:

Grupo I, raro, constituido por individuos cuyo suero no aglutina ningún glóbulo rojo, en tanto que sus glóbulos son aglutinados por todos los sueros excepto los del mismo grupo. Es el grupo de los **receptores universales**, cuya sangre no aglutina los glóbulos rojos humanos transfundidos; puede, entonces, recibirlos sin distinción.

Grupo IV, muy frecuente, de individuos cuyos hematíes no se dejan jamás aglutinar ni hemolizar; por el contrario, su suero aglutina los glóbulos de todos los otros grupos. Es el grupo de los *dadores universales* cuyos glóbulos inaglutinables pueden ser transfundidos a cualquier persona y sin peligro alguno.

Grupo II, igualmente frecuente, posee glóbulos que son aglutinados por el suero de los grupos III y IV y su suero aglutina los glóbulos de los grupos I y III.

Grupo III, raro, es aquel cuyos glóbulos son aglutinados por el suero de los individuos de los grupos II y IV y cuyo suero aglutina los glóbulos de los grupos I y II.

En resumen, los individuos del grupo I pueden recibir sangre de todos los demás grupos y no pueden cederle sino a los de su propio grupo. Los del grupo IV, a la inversa, pueden cederle sangre a todos los individuos y no recibirla, en cambio, sino de los de su propio grupo. Los del grupo II pueden darle sangre a los de los grupos II y I y recibirla de los grupos II y IV. Finalmente, los del grupo III reciben sangre de los grupos III y IV y ceden a los grupos III y I.

Glóbulos rojos de los grupos	SUEROS DE LOS GRUPOS			
	I	II	III	IV
I	—	+	+	+
II	—	—	+	+
III	—	+	—	+
IV	—	—	—	—

¿Cuál es ahora la hipótesis que trata de explicar la constitución de los grupos sanguíneos?

Existe una relación estrecha entre los fenómenos de isoaglutinación y de isohemolisis. No hay, en efecto, jamás isohemolisis en ausencia de isoaglutinación mientras que es posible la isoaglutinación intensa sin isohemolisis.

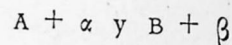
La isohemolisis, contrariamente a la isoaglutinación, exige la presencia de la alexina (elemento lítico) para ejercer su acción.

Se acepta que las reacciones de aglutinación son la consecuencia de la presencia en el suero sanguíneo de dos **aglutininas** que se designan por las letras alfa y beta, que reaccionarían específicamente frente a dos sustancias aglutinables o **aglutinógenos** contenidos en los glóbulos y que se designan por las letras A y B. De tal manera que la aglutinina alfa sólo aglutina el antígeno A, reacción específica y, a su vez, la aglutinina beta lo hace sólo frente al aglutinógeno B. Como principio fundamental en esta reacción antígeno - anticuerpo hay que sentar el siguiente: La aglutinina y el aglutinógeno específico no se encuentran jamás en la sangre de un mismo individuo, porque en esta circunstancia habría aglutinación in vivo y no se concebiría la existencia de hematíes libres circulantes.

La diferente distribución de estos elementos en la sangre de los diversos individuos ha permitido la clasificación de Moss, como lo vamos a demostrar.

Los individuos del grupo I poseen en sus glóbulos ambos aglutinógenos A y B, en cambio, su suero es inactivo, ya que no posee aglutininas. Los del grupo II poseen aglutinógenos A en sus glóbulos y aglutinina beta en el suero. Los del grupo III poseen aglutinógeno B y aglutinina alfa en su suero. Finalmente, los del grupo IV no poseen aglutinógeno en sus glóbulos (O) y sí ambas aglutininas, alfa y beta en su suero.

Se podrá, pues, tener aglutinación cuando en la mezcla de sangre se verifique una de las siguientes combinaciones:



En el esquema a continuación se puede observar claramente las características de cada grupo de acuerdo con lo que acabamos de exponer:

		S U E R O				Sangre
		I o	II β	III L	IV α β	
Glóbulos rojos	I A B	—	+	+	+	0 AB
	II A	—	—	+	+	β A
	III B	—	+	—	+	α B
	IV O	—	—	—	—	α β 0

TÉCNICA DE LA DETERMINACIÓN DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS

(Investigación de la isoaglutinación)

Para reconocer el grupo de un individuo sería necesario lógicamente establecer su "fórmula de aglutinación" frente a sueros de todos los grupos. Pero si se observa atentamente el esquema se verá que basta con buscar estas reacciones frente a los sueros II y III solamente. En efecto, los glóbulos del grupo I son aglutinados por ambos sueros: II y III; los del grupo IV no son aglutinados por ningún suero; los del grupo II lo son por el suero III y los del grupo III, a la inversa, por el suero II. Es, pues, posible, de acuerdo con esto, caracterizar el grupo al cual pertenece un individuo poniendo su sangre frente a los sueros II y III solamente.

1º Procedimiento indirecto (Método de Beth - Vincent):

Es indispensable poseer sueros etalones de los grupos II y III perfectamente controlados y citratados al 1,5%. En estas condiciones se deposita sobre un portaobjetos una gota de suero II en un extremo y en el otro una del suero III etalón. A cada una de ellas se le agrega una gota de sangre del sujeto a clasificar, por punción de la yema del dedo. El citrato impide la coagulación. Mo-

viendo el porta - objetos, manteniéndolo siempre en posición horizontal, se agitan ambas mezclas de sangre y suero y se interpretan los resultados en el transcurso de 5 minutos. Existen cuatro posibilidades macroscópicas.

Si la sangre examinada aglutina con ambos sueros tipos, se trata de un individuo del grupo I (receptor universal).

Si no se observa aglutinación frente a ninguno de los sueros etalones, se trata de un individuo del grupo IV, (dador universal).

La aglutinación de la sangre frente al grupo II, con ausencia del fenómeno frente al grupo III, nos revela un individuo de este último grupo, III.

El caso contrario, es decir, aglutinación frente al suero etalón III únicamente nos revela un individuo perteneciente al grupo II.

Como control puede utilizarse un suero etalón del grupo IV que suministra una garantía suplementaria.

2º Procedimiento directo (Método de Jeanbrau) :

Cuando no se poseen sueros etalones II y III, es posible realizar una "prueba directa" de isoaglutinación entre el suero del futuro receptor y los glóbulos rojos de los posibles dadores. Se obtiene sangre del receptor por punción venosa y se recoge el suero apenas se separa. Se mezcla una gota de este suero (previamente citratado) con una gota de sangre del dador en estudio. Si no hay aglutinación (aspecto homogéneo) la sangre del dador eventual es utilizable, ya que sólo tienen importancia la iso - aglutinación y, por lo tanto, la lisis de los glóbulos rojos del dador por el suero del receptor (**incompatibilidad de isoaglutinación**).

Aplicaciones del fenómeno de isoaglutinación.

La noción del grupo sanguíneo es de enorme importancia en Biología, en Medicina Legal y en Clínica. En este último terreno bástenos recordar el papel fundamental que desempeña en la transfusión sanguínea cuyas indicaciones y aplicaciones aumentan diariamente, como igualmente en las inmunotransfusiones.

La propiedad individual de la sangre puede ser utilizada en Medicina Legal en el reconocimiento de las relaciones de filiación, es decir, para la investigación biológica de la paternidad.

Fijeza de los grupos sanguíneos.

Se tiene hoy la noción de la inmutabilidad de los grupos sanguíneos. Constituirían un carácter hereditario transmitible según las leyes mendelianas:

a) Las "estructuras bioquímicas" A y B de los hematíes no aparecen jamás en los niños sino están presentes, por lo menos, en uno de los padres.

b) Cuando los padres presentan la misma estructura, los niños tienen, en general, pero no siempre, el grupo sanguíneo de ellos.

c) La estructura ausente en los padres faltará igualmente en los descendientes.

EXPERIENCIAS

1.—Procédase a clasificar el grupo sanguíneo a que pertenecen los diferentes alumnos, de acuerdo con la técnica descrita más arriba, es decir, utilizando sueros II y III como etalón.

2.—En presencia de un suero, que se considera como futuro receptor, practíquese la prueba directa de hemoaglutinación, utilizando los glóbulos rojos de los alumnos que actúan como posibles dadores.

3.—En un tubo de ensayo póngase en presencia suero hemolítico, frente a los glóbulos rojos que han actuado como antígeno. Demuéstrese la aglutinación de los hematíes que precede a la lisis de los mismos. Si el suero se calienta previamente a 56 grados, se produce siempre la aglutinación pero no la lisis (destrucción de la alexina).

CAPITULO XIII

PODER REACCIONAL DEL ORGANISMO Y SUS VARIACIONES

El papel desempeñado por los anticuerpos en la inmunidad no es exclusivo. Las verificaciones experimentales y las observaciones clínicas demuestran que no existe paralelismo estricto entre el estado de inmunidad y el título de los anticuerpos. Pueden desaparecer los anticuerpos de un organismo inmune sin que esto afecte a la refractariedad adquirida natural o artificialmente. Es posible también la existencia de una inmunidad adquirida (vacunación local, según Besredka), sin la intervención de los anticuerpos.

Los hechos anteriores dejan presumir la existencia de otros factores en la inmunidad. Uno de los factores más importantes está constituido por las modificaciones del **poder reaccional** del organismo frente a un antígeno determinado. Hay variaciones individuales de reacción del organismo en presencia de una dosis determinada de antígeno, (caballos buenos o malos dadores de anticuerpos, conejos buenos o malos suministradores de sueros aglutinantes o precipitantes, etc.). Existe, pues, una aptitud reaccional particular en la elaboración de los anticuerpos, lo que constituye un factor individual. Se puede asignar con el nombre de **ergia** este coeficiente personal de reaccionar a la introducción de un antígeno.

Hiperergia. — La penetración de un antígeno no sólo provoca la aparición de anticuerpos, sino que hace al organismo más apto a producirlos a cada nuevo contacto con ese antígeno. Es el es-

tado hiperérgico propio de los vacunados y de la inmunidad adquirida naturalmente.

Anergia. — Es la desaparición de todo poder reaccional frente a un antígeno determinado. De mecanismo obscuro, es un estado frecuente en determinadas enfermedades infecciosas: grippe, sarampión, coqueluche, escarlatina, etc. El estado anérgico se revela por la desaparición de los anticuerpos del organismo (poder aglutinante, sensibilizadora para la reacción de Wassermann, antitoxinas, etc.) y de las reacciones cutáneas (tuberculínicas).

Alergia. — Según el concepto de Pirquet, sería una modificación érgica del organismo en el sentido de la aparición inmediata o acelerada de las reacciones. Las reacciones en las reinoculaciones se hallan modificadas cronológica, cualitativa y cuantitativamente. Es un estado difícil de definir y de separar de la hiperergia, pero que corresponde más especialmente a una hipersensibilidad celular adquirida frente a un antígeno. Sería un estado hiperérgico celular. El fenómeno de Koch y las reacciones tuberculínicas son manifestaciones evidentes de estados alérgicos de la tuberculosis. Estos estados hiperérgicos celulares pueden disminuir o desaparecer, al igual que lo hacen los anticuerpos, en los estados de anergia.

Anafilaxia. — La primo-inyección de un antígeno puede, en ciertos casos, sensibilizar extraordinariamente al organismo frente a ese mismo antígeno. El antígeno anafiláctico debe ser de naturaleza albuminoídea y tener las propiedades de peso molecular, solubilidad, estado coloidal, etc., que caracteriza a los antígenos en general. Las proteínas bacterianas no son, sin embargo, anafilactizantes, lo que constituye una superioridad de las vacunas sobre los sueros.

La dosis antigénica preparante puede ser extremadamente débil (1 millonésimo de c.c. de suero de caballo para sensibilizar un cuy). La dosis óptima varía entre $1/10^0$ y $1/100^0$ de c.c. Las dosis débiles sensibilizan a menudo en forma más rápida e intensa que las dosis fuertes (Besredka).

La sensibilización puede obtenerse por diversas vías: intravenosa, peritoneal, subcutánea, etc. La vía digestiva no es propicia en la anafilaxia experimental, pero las observaciones clínicas (intolerancias alimenticias) y los accidentes séricos precoces y graves con las inyecciones de suero en los individuos que se alimentan de carne de caballo, revelan la sensibilización digestiva. La vía respiratoria

(asma respiratoria) y la vía ocular permiten igualmente la sensibilización del organismo.

Un período de incubación es indispensable para establecerse la hipersensibilidad. Puede variar según el antígeno o la dosis pero no puede ser inferior a 8 ó 12 días.

Las dosis desencadenantes pueden ser débiles y su eficacia está relacionada íntimamente con la vía de introducción. La vía intravenosa e intracerebral son las más seguras y severas.

Los fenómenos anafilácticos son estrictamente específicos. Los animales preparados con suero de caballo no reaccionan jamás a una inyección desencadenante de albúmina de huevo.

Existe una **anafilaxia pasiva** del todo comparable a la inmunidad pasiva. Con una dosis suficiente de suero del animal anafilactizado es posible provocar en un animal nuevo y casi inmediatamente el estado de anafilaxia. La duración de la hipersensibilidad conferida pasivamente no sobrepasa de 15 a 20 días.

Fenómeno de Arthus. — Anafilaxia local. — Si se inyecta bajo la piel de un conejo 10 c.c. de suero de caballo, no se observa reacción alguna; pero si se repiten estas inyecciones a dosis más débiles (5 c.c.), se observa primero un poco de edema, después un edema pseudo-flegmonoso y por último la gangrena o la necrosis aséptica (en la quinta o sexta inyección). El fenómeno es específico.

Síntomas generales de la anafilaxia experimental. — El cuadro sintomático es semejante para las especies en estudio y se realizan al máximo en el cuy, por ser el animal más sensible a las inyecciones intravenosas. La inyección desencadenante determina de inmediato la agitación, la inquietud, el rasquido, la tos, la emisión de materias fecales y de orina. Si la dosis es suficiente, se observan movimientos giratorios, convulsiones, disnea, caídas de costado y muerte rápida del animal.

En el conejo la fase de excitación es más corta y la fase parálitica más prolongada que en el cuy. En el perro predominan los fenómenos gastro-intestinales (vómitos y diarreas sanguinolentas).

Aplicaciones prácticas del concepto de anafilaxia. — La noción de anafilaxia y de shock ha sido fecunda en patología y en medicina y ha aclarado la patogenia de numerosas enfermedades. Mu-

chas aplicaciones prácticas han nacido de tales conceptos, que es posible resumirlas en dos grandes grupos:

1º *Las reacciones de anafilaxia*, reveladoras del estado de hipersensibilidad del organismo frente a una substancia determinada, lo que constituye un precioso procedimiento de diagnóstico en múltiples enfermedades infecciosas y parasitarias.

Las **cuti-reacciones** utilizadas en la práctica médica corriente son numerosas y obedecen como mecanismo a las reacciones de anafilaxia local. Tales son las cuti-reacciones a la tuberculina, a la metilina, a la maleína, al líquido hidatídico, etc. Las cuti-reacciones con proteínas animales o vegetales están destinadas a revelar los estados de hipersensibilidad que son el origen de los estados anafilácticos: polen, proteínas alimenticias, pelos, plumas, etc. Con estas cuti-reacciones se puede afirmar el origen anafiláctico de varias afecciones y precisar la causa de una sensibilidad determinada del organismo: asma anafiláctica, coriza espasmódica, romadizo del heno, jaquecas, urticarias, eczemas, etc.

2º *La anti-anafilaxia.* — Los frecuentes accidentes anafilácticos han orientado hacia la creación de métodos protectores anti-anafilácticos:

Preservación contra el shock.

a) Puede obtenerse mediante la *anti-anafilaxia específica*: inyección previa de una pequeña dosis de la substancia anafilactizante. Es posible demostrar experimentalmente la anti-anafilaxia por los métodos de Besredka de las vacunaciones subintrantes y de la anti-anafilaxia local.

b) También es posible obtener la *anti-anafilaxia no específica* mediante inyecciones de proteínas diversas: peptonas, extractos de órganos, diastatas, leche aséptica, autoseroterapia, autohemoterapia, etc.

EXPERIENCIAS

1º *Anafilaxia en el cuy.* — Después de 12 días de la inyección sensibilizante de suero normal de caballo, proceder a desencadenar el shock mediante la inyección intracardiaca del mismo antígeno. Observar los síntomas que se presentan.

2º *Especificidad de la anafilaxia.* — En cuyes sensibilizados con suero de caballo inyectar albúmina de huevo diluida al $\frac{1}{4}$.

3° *Anafilaxia pasiva.* — Obtener 1 c.c. de suero de conejo sensibilizado con suero de caballo cinco semanas antes y proceder a inyectar intraperitonealmente en dos cuyes 0,5 c.c., respectivamente.

Inyectar a las 24 horas después y por vía intravenosa 0,2 c.c. de suero de caballo. Observar los síntomas de anafilaxia y discutir su naturaleza.

4° *Anti - anafilaxia.* — Inyectar 1/50 de c.c. de suero de caballo en el peritoneo de un cuy ya sensibilizado. Proceder a la inyección intracerebral, (1 ó 2 horas después) de 1/8 de c.c. Observar la protección comparativamente con un animal testigo sin inyección previa.

5° *Anafilaxia local.* — (*Fenómeno de Arthus*). — Observar los conejos con inyecciones subcutáneas seriadas de suero de caballo.

6° *Reacciones alérgicas.* — Observar la reacción cutánea provocada por la inyección de tuberculina en los cuyes tuberculizados.

CAPITULO XIV

VACUNAS

DEFINICIÓN.—*Las vacunas están constituidas por suspensiones de microbios (vivos o muertos) o por sus productos (filtrados de cultivos, toxinas). Introducidas en el organismo son capaces de determinar la formación de anticuerpos y de conferir la inmunidad en forma específica.*

La vacunación constituye la **inmunización activa adquirida artificialmente** y puede ser utilizada para evitar la aparición de la enfermedad infecciosa (**vacunación preventiva**), o bien para provocar o acelerar la curación de la enfermedad declarada (**vacunación curativa o vacunoterapia**).

MÉTODOS DE VACUNACIÓN

Existen diversos métodos, los que se pueden clasificar de la manera siguiente:

- a) *Vacunación por gérmenes vivos.*
- b) *Vacunación por gérmenes muertos.*
- c) *Vacunación por productos microbianos solubles.*
- d) *Vacunación por bacteriófago.*

a) *Vacunación por gérmenes vivos:*

Puede hacerse por:

- 1.—*Gérmenes vivos no modificados.* — El principio de este

método está basado en el hecho de que introducidos los gérmenes por una puerta de entrada distinta a la de la infección natural, provocan una infección benigna suficiente para inmunizar (vacuna anti - colérica de Ferrán).

2.—*Gérmenes atenuados.* — Estas vacunas están constituidas por gérmenes vivos cuyas propiedades patógenas han sido atenuadas por un artificio apropiado: envejecimiento, cultivo a temperaturas disgenésicas, cultivos en medios biliados (B. C. G.), etc.

En esta clase de vacunación es preciso llegar a obtener lo que se denomina **virus fijo** (Vacuna, B. C. G., vacuna antirábica, etc.).

b) Vacunación por gérmenes muertos:

Este método constituye una vacunación eficaz en un gran número de infecciones y es el más usado en la actualidad; presenta, además, la ventaja de estar desprovisto de poder patógeno, aunque suele provocar a veces reacciones: (reacción general, reacción local y reacción focal).

TECNICA DE PREPARACION.

La preparación de vacunas por gérmenes muertos obedece a reglas de técnica general que conviene conocer y que exponemos a continuación:

- a) *Cultivo.*
- b) *Recolección.*
- c) *Titulación.*
- d) *Ampolletage.*
- e) *Esterilización, y*
- f) *Control.*

a) *Cultivo.* — Pueden utilizarse medios líquidos o sólidos. Se usan de preferencia los sólidos, porque los líquidos contienen sustancias proteicas que al ser inyectadas pueden actuar como agentes de shock.

La siembra en medios sólidos puede hacerse en tubos o en placas de Roux, según la cantidad que se necesite.

b) *Recolección.* — La recolección se hace agregando suero fisiológico estéril a los tubos o placas de Roux. Por agitación o raspado se desprenden las colonias microbianas de la superficie del agar obteniendo así una emulsión densa que es preciso titular (esta es la llamada *emulsión madre*).

c) *Titulación.* — Obtenida la emulsión es preciso diluirla en un excipiente, ya sea suero fisiológico estéril, el más usado, o en aceites vegetales purifi-

cados (lipovacunas), etc. La titulación o numeración por centímetro cúbico puede hacerse por varios métodos, de los cuales los más usados son los siguientes:

Numeración microscópica. — Se utiliza una cámara cuenta - glóbulos cuadrada (Thoma - Zeiss) y cuyo volumen total se ha calculado previamente, por ejemplo 1/4000 de milímetro cúbico. Se coloca en la célula o cámara una gota de la emulsión teñida por el azul de metileno o fucsina. Se toma el término medio del número de gérmenes encontrados en varios cuadrados y se multiplica primero por 4000 para tener el número contenido en un milímetro cúbico y en seguida por 1000 para obtener la cantidad total por centímetro cúbico.

Método de Wright. — Mezclar con una pipeta de Wright, 1 volumen de sangre humana (proveniente del dedo o de la oreja), 1 volumen de emulsión microbiana y 1 volumen de suero fisiológico. Esta mezcla se extiende sobre láminas, se fija, se tiñe con tionina fenicada o con Giemsa y se observa con inmersión. Deben contarse en varios campos microscópicos simultáneamente el número de glóbulos rojos y el de gérmenes; por ejemplo, si se encuentran 500 glóbulos y 670 gérmenes, se establece la proporción siguiente:

$$X = \frac{670 \times 5.000.000}{500} = 6.700.000 \times 1000.$$

Así tenemos el número de gérmenes por centímetro cúbico. Este método es poco usado, pues tiene muchas causas de error.

Método opacimétrico. — Consiste en la comparación de la opalescencia de la emulsión madre a titular con la opalescencia de emulsiones tituladas de este mismo germen por los métodos anteriores (emulsión tipo, test o etalón).

Las diferencias de opalescencia entre dos suspensiones son apreciables cuando la diferencia del número de gérmenes es superior a 25 millones por centímetro cúbico.

Las emulsiones test o etalones se preparan en los laboratorios de la manera siguiente: en una serie de tubos se coloca agua formolada al 0,5% y emulsión microbiana en títulos crecientes desde 50 millones hasta 400 millones, aumentando 50 millones en cada tubo. Se cierran los tubos a la lámpara y se conservan en la obscuridad. Los tubos que sirven para comparar las suspensiones vacunales con las suspensiones test deben ser del mismo calibre y del mismo vidrio.

Para apreciar con mayor exactitud las diferencias de opalescencia se usan aparatos especiales llamados nefelómetros o fotómetros.

Un método práctico es la comparación por opacimetría con los tubos de la escala de Brown. Estos tubos, de ocho centímetros de largo por 4 milímetros de ancho, numerados de 1 a 10 y cerrados a la lámpara, contienen suspensiones de sulfato de bario desde 1 por mil a 1 por ciento; de tal modo, que el número 2 es de doble opacidad que el número 1; el número 3, triple, y el número 10, diez veces más opaco que el primero. La suspensión del sulfato está hecha en solución de citrato sódico al 1 por 100 y lleva, además, gelatina para solidificar la suspensión y que no se sedimente al sulfato. En un tubo de exactas dimensiones se

compara la opacidad de la suspensión con la de los tubos de la escala; se aprecia la igualdad de la opacidad con alguno de ellos, tratando de leer una hoja impresa a su través. El siguiente cuadro de Brown, modificado por Cumingham y Thimothy, da la concentración en millones por centímetro cúbico y su correspondencia en peso de bacteria desecada, también por centímetro cúbico de los gérmenes más corrientes, en la opacidad correspondiente al tubo número 1.

	Millones por c.c.	Miligramos por c.c.
<i>Neisseria catarrhalis</i> (en agar suero)	400	0.250
Vibrión colérico	1.100	0.222
Bacilo de Pfeiffer	1.100	0.204
Gonococo	400	0.196
Neumococo	700	0.172
Meningococo	500	0.166
Bacilo piocianico	500	0.166
Streptococo	300	0.166
<i>Neisseria catarrhalis</i> (en agar común)	400	0.156
<i>B. disenterico</i>	500	0.143
<i>B. tifico</i> , para - tifico <i>B. colibacilo</i>	400	0.138
<i>Brucella melitensis</i>	800	0.133
Estafilococo dorado	400	0.118
Estafilococo blanco	300	0.105

d) *Ampolletage*. — Una vez titulada la emulsión madre se diluye hasta el título deseado agregándole un excipiente cualquiera (suero fisiológico, yatrén, etc.) y se procede a la repartición en ampolletas por medio de una pipeta en bola para las pequeñas cantidades o aparatos repartidores especiales para grandes cantidades. Las ampolletas deben cerrarse herméticamente al mechero de Bunsen o al soplete.

e) *Esterilización*. — Puede obtenerse por varios procedimientos. El más usado es el calor. Una temperatura suficiente para destruir la vitalidad de los gérmenes no esporulados no altera sus propiedades antigénicas. La temperatura usada y el tiempo de duración son variables para cada especie microbiana.

También se emplean los antisépticos, tales como: el éter, alcohol - éter, yatrén, yodo, formol, etc.

f) *Control*. — Se siembra el contenido de una o dos ampolletas ya esterilizadas en medios aerobios y anaerobios; si al cabo de 24 a 48 horas no hay desarrollo, puede entregarse la vacuna para su uso.

VARIANTES DE LAS VACUNAS POR GERMENES MUERTOS

Vacuna sensibilizada. — Consiste en mezclar una emulsión microbiana muerta por el calor con su antisuero correspondiente. Después de doce horas de

contacto se decanta, se lava el residuo por centrifugación y se emulsiona en un excipiente.

En estas vacunas la toxicidad se halla disminuída y estimulan la fagocitosis.

Vacuna de los productos de lisis microbiana. — Los gérmenes se lisan espontáneamente por envejecimiento, además, se pueden lisar artificialmente por agentes físicos (presión), agentes químicos (soda) y por agentes biológicos (bacteriófago).

Los lisados contienen las proteínas bacterianas entre las cuales están las proteínas tóxicas o endotoxinas. La acción de estas vacunas es comparable a la de los cuerpos microbianos muertos.

c) *Vacunación por los productos solubles microbianos*:

Este método consiste en la vacunación por las toxinas solubles hechas atóxicas (anatoxinas) por la acción del calor (40 grados) y del formol (4%). En estas condiciones desaparece el poder tóxico y se conserva íntegramente el poder antigénico.

La anatoxina más empleada en la actualidad es la anatoxina diftérica. Existe la posibilidad de emplear este método en otras toxoinfecciones tales como: tétanos, disentería, botulismo, etc.

Además del formol pueden utilizarse otras sustancias anatóxicas tales como la acroleína, aldehído etílico, los jabones, etc.

La **vacunación local** mediante los **antivirus** de Besredka, que tienden a saturar las "células receptoras" de sus afinidades para con los gérmenes, es otro ejemplo de inmunización por productos solubles microbianos.

d) *Vacunación por el bacteriófago*:

Estas vacunas representan un antígeno complejo (bacteriófago y cuerpos microbianos lisados por él).

Se obtiene por este método una inmunización activa por los productos de lisis microbiana y además una diseminación en el organismo de un bacteriófago de poder lítico activo.

AUTO Y HETEROVACUNAS

Las vacunas preparadas y que se expenden en el comercio constituyen las heterovacunas, denominadas también **stock - vacunas**. Estas vacunas pueden estar constituidas de una sola cepa microbiana

(**vacuna monovalente**). Cuando la vacuna se prepara con varias cepas de una sola especie microbiana, se denomina **vacuna polivalente**; ejemplo: la estafilovacuna preparada con estafilococo dorado, citrino y blanco.

Se llaman **vacunas mixtas** aquellas que se preparan con dos o más especies de gérmenes. Ejemplo: la vacuna T A B preparada con bacilos tíficos y paratíficos A y B.

Las autovacunas se preparan con el o los gérmenes aislados del enfermo. Son de uso muy frecuente, especialmente en infecciones piógenas. Tienen la ventaja sobre las stock - vacunas de poseer una mayor especificidad, puesto que se emplea el mismo antígeno provocador de la infección.

El método de preparación es idéntico al descrito anteriormente para la preparación de vacunas por gérmenes muertos. La titulación depende de las especies microbianas aisladas y de la edad y del estado general del enfermo.

CAPITULO XV

SUEROS

El concepto de suero terapéutico engloba el estudio de los procedimientos de prevención (**seroprofilaxis**) y tratamiento (**seroterapia**) de las enfermedades infecciosas mediante el suero de los animales y del hombre inmunizados contra ellas.

La seroterapia tiene por objeto la **inmunización pasiva adquirida artificialmente**. Entrega los anticuerpos ya formados; es, por lo tanto, de efecto inmediato; pero de duración relativamente corta, dado que tratándose de una albúmina extraña, el organismo receptor tiende a eliminarla.

MÉTODOS SEROTERÁPICOS.

Los sueros se clasifican en tres grandes grupos:

- a) *Sueros antitóxicos,*
- b) *Sueros antimicrobianos,*
- c) *Sueros mixtos.*

Los sueros antivenenosos, dado el carácter del antígeno con que se preparan, pueden incluirse en la categoría de los sueros antitóxicos.

Llamamos **suero homólogo** a aquel que proviene de individuos o animales de la misma especie (suero de convalecientes). **Suero heterólogo**, el que proviene de individuos o animales de distinta especie.

Se preparan en general inmunizando los animales contra las toxinas. En esta preparación se distinguen varias etapas:

Elección de los animales.

Los animales que se utilizan para la preparación de los sueros son los caballos. Se prefieren por una serie de razones: fácil manejo; poca sensibilidad para las inoculaciones y las extracciones; cantidad de suero que proporcionan (50 por ciento más o menos de la cantidad total de sangre); poca toxicidad del suero; gran cantidad de anticuerpos y finalmente, por el bajo costo.

Estos animales suministran mensualmente alrededor de 6 litros de sangre, lo que permite obtener en 2 sangrías más o menos 3 litros de suero.

Se prefieren, por otra parte, animales viejos y que posean anticuerpos naturales, lo que se investiga por las intradermo - reacciones específicas.

Inmunización de los animales.

La inmunización se obtiene por la inyección de dosis progresivamente crecientes de toxina pura o atenuada (toxoides, anatoxinas).

Las primeras dosis, insuficientes para provocar la muerte, permiten el acostumbamiento del animal a dosis más y más fuertes hasta alcanzar así una inmunidad absoluta.

La inyección se hace, generalmente, por vía subcutánea; el animal experimenta una reacción local que sirve de control para fijar la periodicidad de las inoculaciones. Se establecen así diferentes esquemas de inmunización, en relación con la toxina y las reacciones que el animal experimenta.

En líneas generales, se hacen inyecciones bisemanales y se continúa en esta forma durante 2 meses, más o menos, al cabo de los cuales se practica una sangría exploradora para estudiar el título del suero. Si éste es satisfactorio se procede a la obtención del suero.

Obtención del suero.

Se hace la sangría, más o menos después de 8 a 15 días de la última inyección del antígeno. La víspera de la sangría se deja el animal en ayuno para evitar la bacteremia digestiva que contaminaría el suero; con ello se obtiene, además, un suero más limpio y libre de lipoides derivados de la digestión.

La sangría se practica asépticamente a nivel de la vena yugular por medio de trócares estériles que se comunican por medio de tubos de goma, a recipientes especiales que permiten recoger la sangre y obtener secundariamente el suero en forma estéril.

Titulación:

La medida del poder antitóxico de un suero se hace, en general, estudiando cuál es la más pequeña dosis de antitoxina susceptible de neutralizar la toxina que le ha servido de antígeno. Esta titulación se puede efectuar in vitro como in vivo. Los procedimientos de titulación in vitro son los corrientemente empleados y entre ellos especialmente dos: 1) el *procedimiento de Ehrlich*, y 2) la *titulación por floculación*.

1) La *titulación por el método de Ehrlich* exige un suero standard o etalón, que se considera como una unidad antitóxica y en relación al cual se titulan los sueros de los diferentes institutos. Se justifica el que se utilice al suero como etalón y no a la toxina por la constancia de la actividad del primero y la conservación integral de sus propiedades aun después del envejecimiento.

Para titular el suero que acaba de ser preparado se titula previamente la toxina que le ha servido de antígeno en relación con el suero etalón. Se busca así lo que se llama el L +, es decir, la cantidad de toxina que hay que mezclar a una unidad antitóxica para que mate al cuy al cabo de 3 ó 4 días; en la práctica un cuy de 250 gramos. Titulada la toxina, podemos titular el suero a investigar. Se utiliza el L + como dosis de toxina conocida que se pone en presencia de diluciones crecientes de suero. Se inyecta esta mezcla, a cuyes de 250 gramos y se concluye que la mezcla que mata al cuy al cabo de 3 días contiene una unidad antitóxica (1 U. A.).

En resumen, con el suero etalón se titula la toxina y con la toxina recién titulada se titula el suero que se desea.

2) Para ciertos sueros, como el suero antidiftérico, se puede reemplazar la investigación en cuyes por la búsqueda de la *reacción de floculación de Ramón*.

Este procedimiento se basa en el estudio de los fenómenos de floculación que se producen en las mezclas de toxina antitoxina cada vez que hay neutralización. En efecto, se ha visto que mezclando a concentraciones diferentes toxinas y antitoxinas el primer tubo en que se produce la floculación corresponde a la neutralización exacta de ambos elementos. Se puede, así, titular una toxina en relación con el suero etalón y titulada la toxina se procede a titular el suero a investigar utilizando la toxina a dosis fijas y el suero a diluciones variables.

Purificación.

Sabemos que los anticuerpos están adosados a ciertas globulinas. La purificación tiene por objeto, entonces, la liberación del suero de las albúminas que no llevan anticuerpos y cuya presencia es desfavorable, porque actúan como albúminas extrañas. La purificación se hace precipitando dichas albúminas por disoluciones salinas diversas y a concentraciones variables. Las más frecuentemente usadas son los sulfatos de sodio, magnesio y amonio.

La purificación trae como consecuencia lógica la concentración de los anticuerpos del suero.

Se termina la preparación del suero filtrándolo por bujía que asegura la esterilidad y ampollándolo.

SUEROS ANTIMICROBIANOS

Se obtienen inoculando el antígeno por vía endovenosa.

Existe gran dificultad para titular estos sueros, especialmente por el inconveniente de no poder reproducir en los animales la infección experimental. En líneas generales, se titulan buscando la **dosis protectora** para el animal. Se inyectan los animales receptivos con dosis variables de suero y se investiga en seguida qué dosis de microbios virulentos son capaces de soportar. Sin embargo, no existe un procedimiento standard que permita una comparación entre los diferentes sueros, dado que la virulencia microbiana es un carácter muy variable.

Se pueden titular, además, estos sueros por la investigación de la tasa de los anticuerpos, lo que da aún menos garantías.

El mejor procedimiento de titulación nos lo da la clínica. Ella puede apreciar el poder curativo o preventivo de un suero.

La preparación se hace en líneas generales de acuerdo con la técnica que hemos indicado para los sueros antitóxicos.

SUEROS MIXTOS

Se preparan con especies microbianas que gozan de ambos poderes agresivos: la virulencia y la toxicidad. Como tipo podemos citar los sueros antigangrenosos.

Para obtener estos sueros se pueden inocular los cultivos totales, o bien, separadamente los cultivos filtrados (toxinas) y los microbios emulsionados; las toxinas, por vía subcutánea, los microbios, por vía endovenosa.

La titulación se hace combinando los dos métodos que hemos indicado precedentemente para los sueros antitóxicos y antimicrobianos. El resto de su preparación no ofrece nada de particular.

SUEROS CONTRA LOS INFRAMICROBIOS

Son, en general, sueros de convalecientes, porque muchas de las infecciones a inframicrobios son netamente humanas. El suero del convaleciente se recoge, generalmente 8 días después del período de efervescencia. Se hace con la sangre las reacciones de Wasserman y las reacciones de prueba para la tuberculosis y si resultan negativas se extrae el suero y se reparte en ampollitas. Su actividad dura al parecer sólo algunos meses.

VÍAS DE INTRODUCCIÓN DEL SUERO

El suero puede ser inyectado por vía venosa, muscular, subcutánea, raquídea, articular, traqueal, pleural, bucal o rectal. Las dos últimas vías se las emplea excepcionalmente y son a menudo ineficaces. En ciertas ocasiones puede emplearse el suero localmente, en la piel o en las mucosas o bien a nivel de las infecciones localizadas.

1) La *vía venosa* siendo la vía ideal para la seroterapia, tiene sus ciertos peligros cuando las inyecciones deben ser masivas y en la práctica no es recomendable inyectar más de 40 a 50 c.c. por esta vía. Es de temer, también, la producción de accidentes anafilácticos en las reinoculaciones, debiéndose, en todo caso, inyectar lentamente. La vía venosa debe considerársela de urgencia. En las intoxicaciones o en las infecciones graves la primera dosis puede ser inyectada por vía venosa para continuarse el tratamiento seroterápico por vía subcutánea o muscular.

En la seroterapia antimicrobiana y especialmente en las infecciones septicémicas, la vía venosa es, a veces, la única eficaz.

2) La *vía muscular* permite una difusión rápida de los sueros terapéuticos y, a su vez, altas dosis (100 c.c.), siendo un poco dolorosa. No expone a los accidentes anafilácticos bruscos.

3) La *vía subcutánea* es de difusión más lenta pero permite la introducción fácil de dosis elevadas de sueros (tejido subcutáneo abdominal, cara externa del muslo). Es la vía recomendada para continuar el tratamiento después de la primera inyección de suero por vía venosa.

4) La *vía raquídea* o *ventricular*, es de rigor en ciertas afecciones meningo - encefálicas, ya que los sueros no vencen los plexos coroideos y los anticuerpos no llegan al líquido céfalo - raquídeo. Se puede inyectar 40 a 60 c.c. de suero por vía raquídea, pero la repetición prolongada suele provocar accidentes de meningitis séricas.

5) La *vía articular* es empleada en las artritis, especialmente gonocócicas.

6) Las *aplicaciones locales*, de sueros son utilizadas en especial en los portadores de gérmenes, en la difteria, escaras, gangrenas, etc.

7) Las *vías bucal y rectal*, son generalmente ineficaces ya que los anticuerpos son destruidos por las secreciones gastrointestinales y la absorción por las mucosas es lenta e incompleta.

Posología.—Es variable, según los sueros, el grado de intoxicación y de infección, la precocidad del diagnóstico, etc. *La inyección debe ser precoz y las primeras dosis de suero muy elevadas.*

SEGUNDA PARTE

BACTERIOLOGIA ESPECIAL

SEGUNDA PARTE

CAPITULO XVI

CARBUNCO

BACTERIDIA DE DAVAINE. (BACILLUS ANTHRACIS)

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Aspecto microscópico.

1) En la *sangre y en las vísceras* la bacteridia se presenta bajo la forma de bastoncitos capsulados de 5 a 10 micrones de largo por 1 a 1,5 micrones de ancho, con sus extremidades cortadas en ángulo recto. Se encuentran generalmente aislados.

2) En *los cultivos*, especialmente en los líquidos, se unen en largas cadenas que aparecen como filamentos sinuosos, cilíndricos, entrelazados como madejas de hilo enredadas. Ya a las 24 horas de cultivo se observan esporas que aumentan progresivamente con la edad del cultivo.

Coloración. — Gram positivos.

Cápsulas. — Se observan especialmente en la sangre y en las vísceras de los animales infectados. En los cultivos ordinariamente no está capsulado. Para ponerlas en evidencia se usan métodos de tinción especiales para cápsulas.

Esporas. — Condición indispensable para que se formen, es la presencia de oxígeno libre; de ahí que no se las encuentre ni en la sangre ni en los tejidos recién extraídos de los organismos infectados, como tampoco en los cadáveres de animales muertos por esta infección. Es evidente que no tardarán en aparecer en los cultivos o en los productos patológicos esparcidos fuera del animal o del cadáver (orina, por ejemplo), ya que el oxígeno libre está presente en estos casos.

En cuanto a la temperatura, las esporas sólo se desarrollan entre 18 y 41,5 grados. A 42 grados ya no se forman ("forma asporógena").

La espora tiene el aspecto de grano ovoídeo, refrigente, que ocupa la parte central del bacilo sin deformarlo. Cada bacteridia no produce sino una espora.

ASPECTO DE LOS CULTIVOS

El *Bacillus Anthracis* se desarrolla en todos los medios corrientes entre 20 y 44 grados.

Temperatura óptima, 37 grados.

Aerobio; anaerobio facultativo.

Caldo ordinario. — Antes de las 24 horas se observan copos en la superficie del líquido y en las paredes del tubo. El resto del caldo permanece transparente. Después de algunos días los copos caen al fondo formando un sedimento blanquecino.

Gelatina en picadura. — Se observa a las 24 ó 48 horas un trazo central blanquecino del que parten perpendicularmente filamentos plumosos que dan al cultivo el aspecto de un "pino invertido". A nivel de la parte superior del trazo central la gelatina comienza a fluidificarse de manera que a los 10 ó 12 días la licuación es total.

Agar - Agar. — A las 24 horas colonias blanquecinas rugosas, opacas, de bordes ligeramente dentados. Crecen rápidamente en superficie y en espesor.

Disociación microbiana. — Las cepas virulentas dan colonias anchas, rugosas y microscópicamente con bacilos en cadena; los bacilos avirulentos dan colonias más chicas, lisas y morfológicamente constituídas de bacilos aislados, dos gérmenes unidos por sus cos-

tados o pequeñas masas. (Constituye tal apariencia de las colonias una excepción a las características clásicas de las colonias "S" y "R").

Suero coagulado. — Estría blanco mate al principio, grisácea. Al cabo de algunos días licúa al medio.

Leche. — Desarrollo abundante. Coagulación hacia el tercero o cuarto día sin acidificación. El coágulo se redissuelve aproximadamente el octavo día (proteolisis).

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Acción sobre los azúcares. — Escaso o nulo poder fermentativo.

Acción proteolítica. — Licúa la gelatina, el suero coagulado y redissuelve el coágulo de la leche. En general esta acción es tardía.

Indol. — No produce.

Hidrógeno sulfurado. — Pequeñas cantidades o negativo.

Acción hemolítica. — Se manifiesta tardíamente. No constante.

Acción reductora. — No tiene.

CARBUNCO EXPERIMENTAL

Animales receptivos y refractarios.

La *laucha*, el *cuy* y el *conejo* son los más receptivos y los más empleados en los laboratorios.

Los bovinos. — Son muy sensibles a la ingestión. Resisten mejor la inoculación subcutánea.

Los equinos. — Muy sensibles a la inoculación cutánea y subcutánea.

Los carnívoros. — En general son poco sensibles; el perro adulto presenta inmunidad natural relativa.

Las aves. — En condiciones naturales son refractarias. Enfriándolas previamente por inmersión en agua (Pasteur) o con anti - términos (Wagner), se logra vencer la inmunidad natural.

Los carneros. — Muy sensibles a la inoculación subcutánea y a la ingestión, a excepción del *carnero de Argelia*, que es refractario.

Vías de inoculación. — Se pueden usar: la cutánea (sea la simple escarificación o la inyección intra-dérmica), subcutánea, digestiva, inhalación, intravenosa e intramuscular.

Para Besredka y sus discípulos es la piel la única puerta de entrada a la infección carbuncosa. Cualquier vía que se emplee sería inocua si no hubieran quedado accidentalmente en la piel bacterias, a favor de las cuales se desarrollaría la infección. De todas maneras, hay un hecho cierto, y es que la piel es el órgano más sensible a la infección.

Síntomas. — La inoculación cutánea o subcutánea en el conejo o en el cuy de productos patológicos o de un cultivo carbuncoso determina, en 12 ó 15 horas, edema en el punto de inoculación, tumefacción de los ganglios vecinos y alza térmica de 1 a 2 grados. En las primeras 24 a 30 horas el estado general se mantiene para agravarse luego bruscamente y después de una aceleración del pulso, hipotermia, el animal cae en coma para morir a los pocos minutos.

Autopsia. — La característica anatómica del carbunco es la presencia de la bacteridia en los capilares sanguíneos, de manera que la invasión de los parénquimas de los órganos es secundaria a la rotura de aquéllos.

A la autopsia comprobamos: edema gelatinoso muy pobre en leucocitos en el punto de inoculación. Sangre oscura repleta de bacilos sin esporas. Hipertrofia del bazo, congestión. Riñones, hígado y pulmones igualmente congestionados.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DEL CARBUNCO

En el hombre el diagnóstico clínico de la "pústula maligna" que es la forma más frecuente de carbuncosis humana, debe confirmarse siempre por la investigación bacteriológica, la cual se hará del exudado contenido en la pústula en la siguiente forma:

- 1.—*Examen directo.* — a) Sin coloración: se observará entre lámina y laminilla bacilos inmóviles, capsulados y sin esporas;
- b) con coloración: bacilos Gram positivos.

II.—*Cultivos.* — Sembrar en los diferentes medios para comprobar sus caracteres.

III.—*Inoculaciones.* — De preferencia en el cuy o en la lancha blanca, a partir del producto patológico. Se utilizará la inyección subcutánea o la escarificación de la piel.

Si se trata de carbunco pulmonar, intestinal o septicémico, sólo el examen bacteriológico del desgarró, de las materias fecales o de la sangre nos permite el diagnóstico específico respectivo.

REACCION DE PRECIPITACION DE ASCOLI:

Esta reacción se utiliza para el diagnóstico de la carbuncosis en los cadáveres de los hombres y de los animales. Su fundamento es el siguiente: los sueros de los animales hiper-inmunizados precipitan los extractos de órganos de animales muertos de carbunco en los cuales existe el polisacárido específico procedente de la cápsula (hapteno).

Técnica. — Triturar y diluir en agua fisiológica los órganos sospechosos. Hacer hervir la emulsión durante varios minutos. Filtrar. El producto de filtración se deja caer gota a gota en la superficie del suero específico. Los dos líquidos se superponen y se forma un precipitado anular en la zona de contacto (floculación).

La reacción es también positiva si se practica en cadáveres que tienen meses y aun años.

La reacción de aglutinación carece de valor, pues es irregular y suelen darla incluso los sueros normales.

BACILOS PSEUDO-CARBUNCOSOS

Son, morfológicamente, análogos a la bacteridia. Se hallan muy repartidos en la naturaleza y sus esporas se evidencian en la tierra, en el polvo, en el agua, en el aire, en la superficie de los vegetales, excrementos de los herbívoros, heridas de guerra, etc.

CARACTERES GENERALES. Bacilos Gram positivos, esporulados. La mayoría poseen cilios vibrátiles y están dotados de movimientos. Se desarrollan bien en los medios ordinarios y forman velos en los medios líquidos. En los Laboratorios constituyen los agentes más frecuentes de contaminación de los medios de cultivo. Los más conocidos son:

Bacillus Subtilis.

Bacillus Mesentericus Vulgatus o Bacilo de la papa.

Bacillus Megaterium.

Bacillus Pseudotetanicus (espora terminal).

Bacillus Mycoides.

El diagnóstico diferencial del *Bacillus anthracis* con los bacilos pseudo-carbuncosos puede hacerse recordando los siguientes caracteres distintivos:

B. ANTHRACIS

- 1 Inmóviles.
- 2 Capsulados.
- 3 Largas cadenas.
- 4 No enturbia los medios líquidos.
- 5 Pino invertido en gelatina.
- 6 R. de precipitación: intensa.
- 7 Patógeno.
- 8 Proteolisis lenta.

B. PSEUDO-CARBUNCOSOS

- Generalmente móviles.
No capsulados.
Aislados o cadenas cortas.
Generalmente enturbian.
Ausente o atípico.
Reacciones débiles.
Avirulento.
Rápida.

CAPITULO XVII

GERMENES PIOGENOS

ESTAFILOCOCO. (*STAPHYLOCOCCUS PYOGENES*)

El Estafilococo se halla comúnmente como saprófito en el aire, en la superficie de la piel y de las mucosas. Como patógeno es uno de los agentes habituales de las supuraciones agudas. En patología se le encuentra a menudo en el pus de los forúnculos, ántrax, osteomielitis, abscesos y flemones diversos. A veces pasan a la sangre y producen septicemias con localización ulterior en la pleura, pericardio, peritoneo, endocardio, árbol respiratorio y urinario, etc. Es, además, un agente habitual de asociación microbiana, complicando a menudo las pleuresías y meningitis tuberculosas, la neumonía, la difteria, etc.

Según la producción de pigmento visible (poder cromógeno) en las colonias, se distinguen tres variedades: **Estafilococo dorado** ("aureus"), **Estafilococo amarillo** ("citreus") y **Estafilococo blanco** ("albus"). Hoy día se admite que la especie es una, ya que este poder cromógeno no constituye un carácter fijo. El aspecto morfológico y los caracteres bio-químicos son idénticos en las tres variedades.

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Aspecto microscópico. — Cocos Gram positivos, inmóviles hasta de 1 micrón de diámetro. En los productos patológicos rara

vez se hallan agrupados en racimo: abundan los coccus aislados, diplococos, grupos pequeños de 4 a 5 elementos y tétradas. En los cultivos predomina la forma en racimo constituido de 40 o más elementos.

MEDIOS DE CULTIVO

Generalidades. — Su cultivo es fácil y abundante aun en los medios pobres en material nutritivo (agua peptonada). Se desarrolla entre los 10 grados y los 44 grados, siendo su óptimum término 37 grados. Anaerobio facultativo.

Caldo. — A 37 grados hay enturbiamiento homogéneo que empieza a las 12 ó 14 horas.

Gelatina. — A 20 grados cultivo granuloso a lo largo de la picadura. La parte superior comienza al tercero o cuarto día a licuarse en cono o embudo no alcanzando el fondo sino en contadas ocasiones.

Agar. — A las 24 horas de permanecer en la estufa aparecen en la superficie del agar numerosas colonias aisladas, redondeadas, espesas, salientes y que confluyen rápidamente para formar una banda ancha, lisa y húmeda. Hay producción de pigmento de la variedad característica.

Papa. — Gran producción de pigmento.

Leche. — Coagulación por fermentación de la lactosa. No hay redisolución posterior del coágulo. (El Tetrágeno no coagula la leche).

Disociación microbiana. — Aparentemente los estafilococos producen colonias semejantes entre sí. Sabatucci aplicando el procedimiento de la tripaflavina pudo demostrar la existencia de dos tipos de colonias: uno aglutinable o liso. Este último tipo sería patógeno y el recomendado en las preparaciones de vacuna.

PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS

Fermentación. — Muy sacarolítico. Fermenta lactosa, glucosa, maltosa, levulosa, sacarosa, manita, glicerina.

Acción proteolítica. — Produce una diastasa que licúa la ge-

latina (gelatinasa) y que peptoniza la clara de huevo. No licúa, en cambio, el suero coagulado.

Producción de pigmento. — La formación de pigmento se hace intensa a 25 grados. Es indispensable la presencia del oxígeno. Dicho pigmento es retenido por el germen; no se difunde en los cultivos (endógeno) y es insoluble en agua. Es soluble en el alcohol, cloroformo y éter y para obtenerlo es necesario destruir los gérmenes.

Producción de toxinas. — (**Hemolisina, leucocidina, exotoxina**). — Los estafilococos producen "in vitro" e "in vivo" toxinas que es posible separarlas de los cuerpos microbianos por filtración y capaces de producir anticuerpos neutralizantes.

En los caldos de cultivos es posible hallar tres sustancias tóxicas diferentes:

1.—*Hemolisina*:

Si se agrega una gota de sangre de conejo a un cultivo de estafilococo en caldo se comprueba, después de algunas horas a baja temperatura que la sangre se ha disuelto completamente (estafilolisina). La producción de hemolisina sería para muchos autores, exclusiva de los estafilococos virulentos. La estafilolisina tiene poder antigénico: inoculada a los animales provoca la formación de suero anti-hemolítico. La antihemolisina existe normalmente en el suero humano y aumenta en el curso de las infecciones estafilocócicas. Se destruye a 56 grados.

2.—*Leucocidina*:

Los glóbulos blancos en las supuraciones a estafilococo se encuentran profundamente alterados debido a la producción de una sustancia destructora o "leucocidina" que se comporta como un fermento soluble; esta sustancia no es un producto de reacción del organismo, pues ella existe en los cultivos. Se destruye a 56 grados. Es fijada por los leucocitos y forma anticuerpos.

3.—*Exotoxinas*:

Estudios recientes evidencian en ciertas cepas de estafilococos la aparición de una sustancia tóxica soluble, capaz de producir

necrosis locales e igualmente la muerte de los animales de laboratorio después de la inyección intracutánea, intravenosa o subcutánea (Porker, Gross, Burnet, etc.). En condiciones especiales de crecimiento (peptona especial, pH determinado, atmósfera de CO₂), se obtiene una toxina capaz de provocar en los conejos inoculados intradérmicamente con 0,02 c.c. una inflamación local que se inicia a las tres o cuatro horas y que se extiende gradualmente hasta provocar al día siguiente una extensa necrosis y ulceración.

Este principio tóxico se inactiva completamente después de una hora a 55 grados. En el hombre produce efectos análogos a los descritos en los animales de laboratorio.

Se ha obtenido un suero neutralizante mediante inmunización de caballos u otros animales capaz de inactivar la toxina "in vitro" (control hemolítico) e "in vivo" (control intradérmico).

Siguiendo principios generales se ha preparado **anatoxina estafilocócica** para el tratamiento de las afecciones producidas por este microorganismo.

Vitalidad. — Conserva largo tiempo su vitalidad en los medios de cultivo y en los productos patológicos. En los cultivos calentados a 80 grados muere a los 15 minutos, y en los productos patológicos resiste varios minutos la acción del vapor de agua a 100 grados.

Virulencia. — El estafilococo aislado del organismo pierde rápidamente su virulencia en los medios de cultivo. La presencia de glucosa en los medios de cultivo y el pasaje por animales exaltan su virulencia.

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

No existe un paralelismo estrecho entre la acción patógena experimental y el poder patógeno natural. Muy a menudo la virulencia de los estafilococos recién aislados del organismo humano (supuraciones, septicemias, etc.), es nula o mediocre.

El conejo es el animal de elección para las inoculaciones.

Los resultados son muy variables, según la virulencia de las cepas, la vía de inoculación y la edad del animal.

La inoculación subcutánea suele producir abscesos que se abren al exterior; la generalización y la muerte del animal es poco frecuente. La inoculación peritoneal produce a menudo una peritonitis fibrino-purulenta mortal. La inoculación endovenosa provoca, según la virulencia del germen desde una septicemia pura sin localización aparente, hasta una piohemia con abscesos en el riñón, en el hígado, pulmón, endocardio, o, si el animal es joven, en los huesos (osteomielitis) en las articulaciones (artritis supuradas).

Los demás animales de laboratorio son menos sensibles que el conejo a la inoculación experimental.

La virulencia se atenúa en los cultivos viejos y se la puede exaltar por pasajes en conejos. La presencia de azúcar exalta la virulencia (predisposición de los diabéticos a las supuraciones).

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Generalidades. — Siendo un germen normal de la piel y mucosas, todo examen se hará previa una antiseptia rigurosa de la región.

a) *Examen directo.* — Los frotis de pus se colorean por el método de Gram con coloración de fondo. Es útil observar la cantidad relativa de cocus Gram positivo y el estado de degeneración de las células de pus.

b) *Cultivo.* — Para obtener colonias aisladas y diagnosticar los gérmenes asociados, si los hay, es preciso cultivar en medio sólido (tres tubos de agar en superficie y por agotamiento).

c) *Hemocultivo.* — Antiseptia muy rigurosa: tintura de yodo en la piel de pliegue del codo y cauterización en el sitio de penetración de la aguja). Recoger 10 cent. cúb. de sangre y sembrarla en un matraz con 200 a 300 c.c. de caldo. Hay que ser prudente en la interpretación de los resultados, sobre todo si hay desarrollo de estafilococo blanco. Es recomendable repetir el hemocultivo hasta tres veces para afirmar el diagnóstico.

d) *Inoculación.* — Se inocula en la vena auricular del conejo cuando se desea estudiar la virulencia de los cultivos.

TETRAGENO (*MICROCOCCUS TETRAGENES*)

El tetrágeno, como el estafilococo, es saprófito del aire, de la piel y mucosa nasal y bucal. Cuando se hace patógeno puede producir diversas supuraciones: anginas, pleuresías purulentas, adenitis, meningitis, abscesos dentarios, septicemias, furúnculos, etc.

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Coccus de un micrón de diámetro. Gram positivos, inmóviles, generalmente agrupados en tétradas y rodeados de una voluminosa cápsula visible en los productos patológicos y en los medios de cultivo albuminosos, desaparece en los cultivos corrientes sin albúmina. Igual que el estafilococo, no produce esporas y constituye un saprófito de la piel y de las mucosas.

MEDIOS DE CULTIVO

Se desarrolla en los medios de cultivo corrientes, entre 15 y 45 grados. Temperatura óptima 37 grados. Anaerobio facultativo.

Caldo. — Enturbiamiento homogéneo a las 24 horas. Después sedimento filante y cremoso.

Agar. — Colonias blancas, cremosas y viscosas.

Gelatina. — La picadura da un cultivo "en clavo", sin liquefacción del medio (diferencia con el estafilococo).

Leche. — Desarrollo sin coagulación (diferencia con el estafilococo).

Suero líquido de conejo. — Conserva la cápsula y su disposición en tétradas.

PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS

Fermentación. — El tetrágeno no fermenta la lactosa ni coagula la leche (diferencias con el estafilococo).

Acción Proteolítica. — No produce indol ni hidrógeno sulfurado.

Hemolisina. — No produce hemolisinas (diferencia con el estafilococo).

Vitalidad. — Conserva su vitalidad por muchos meses en los medios de cultivo. Muere por calentamiento a 60 grados durante 15 a 30 minutos.

Virulencia. — El germen aislado de productos patológicos no pierde su virulencia por pasaje en los medios corrientes de cultivo; por cultivos en sacos de colodión en el peritoneo de los animales sensibles, las razas de tetrágenos saprófitos pueden hacerse virulentas.

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Laucha blanca. — La inoculación subcutánea le produce la muerte por septicemia a las 24 ó 48 horas. La sangre y las vísceras contienen abundantes tétradas capsuladas.

Cuy. — La inoculación subcutánea determina la formación de una escara seca o de un absceso con pus cremoso; el animal muere a los tres o cinco días. La inoculación intraperitoneal produce una peritonitis purulenta y septicemia.

Conejo. — Menos receptivo. La inoculación subcutánea le produce una escara o un absceso y la inoculación intraperitoneal da lugar a una peritonitis.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Seguir las mismas indicaciones que en el caso del estafilococo. La diferencia con el estafilococo se hará:

- 1) Por la disposición frecuente en tétradas.
- 2) Porque no coagula la leche.
- 3) Porque no fermenta la lactosa.
- 4) No licúa la gelatina.
- 5) Posee cápsula en los exudados.
- 6) No es hemolítico.
- 7) Inoculado a la laucha produce septicemia con tétradas capsuladas en los frotos de sangre y vísceras.
- 8) El suero de los enfermos posee aglutininas específicas para el tetrágeno.

BACILO PIOCIANICO (*BACILLUS PYOCEANEUS*)

El B. piocianico o "bacilo del pus azul" de Gessard, como los anteriores, también existe al estado saprófito en la tierra, aguas, en las mucosas y en el lumen intestinal. Como patógeno produce supuraciones caracterizadas por el color azul del pus: otitis, peritonitis, pleuresías, anginas, septicemias.

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Bacilo Gram negativo, de extremos redondeados y con un flagelo vibrátil terminal (monotrico). Muy móvil. Tiene 1 a 1,5 micrón de largo.

Variaciones morfológicas. — La presencia de antisépticos en los medios de cultivo modifica notablemente su morfología. En los caldos con ácido fénico o bicromato de potasio aparecen formas filamentosas; la presencia de ácido bórico da origen a formas espiriláceas; la creosota, a formas de coccus. Sembrado después en medios corrientes recupera su morfología primitiva.

MEDIOS DE CULTIVO

Generalidades. — Cultivado en presencia de oxígeno en todos los medios un pigmento de color azul verdoso difusible; en los medios sin oxígeno el pigmento no se produce. Anaerobio facultativo. Se desarrolla en todos los medios corrientes entre 15 y 45 grados. Optimum térmico, 37 grados.

Caldo. — Enturbiamiento homogéneo con producción de color verde fluorescente que aparece primero en la superficie y que invade después todo el medio. Forma un velo blanco rugoso. Posteriormente el caldo se hace viscoso y desprende un olor aromático característico.

Gelatina. — Licúa el medio en forma cilíndrica. La gelatina toma el color verde fluorescente por la difusión del pigmento.

Agar. — Todo el medio toma color verde fluorescente.

Leche. — Coagula en reacción alcalina por producción de

fermento lab. El coágulo se redisuelve algunos días después (acción proteolítica).

Papa. — Desarrollo abundante. Coloración intensa del medio.

PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS

No tiene acción sacarolítica: no fermenta ningún azúcar. Tiene acción proteolítica intensa; licúa la gelatina, disuelve el coágulo de la caseína, fluidifica el suero coagulado y la albúmina de huevo. posee, además, acción hemolítica.

Vitalidad. — Es muy resistente. Conserva por largo tiempo su vitalidad en los medios de cultivo. Resiste largo tiempo el efecto de los rayos solares. Muere en 10 minutos a la temperatura de 60 grados.

Virulencia. — Persiste largo tiempo en los medios de cultivo, puede exaltarse por pasajes por los animales sensibles.

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Conejo. — La inoculación subcutánea o intraperitoneal da resultados poco seguros. La inoculación intravenosa mata al animal en dos o tres días. El animal presenta una enfermedad aguda con fiebre, albuminuria y diarrea. A la autopsia se encuentran pocos gérmenes en la sangre pero son muy abundantes en el bazo, hígado y riñones. A veces la enfermedad se hace crónica y se acompaña de enflaquecimiento y parálisis de las extremidades.

Cuy. — La inoculación subcutánea o intraperitoneal provoca septicemia.

Laucha blanca. — La inoculación por cualquier vía produce una septicemia que mata rápidamente al animal.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El pus de las heridas infectadas es de color azul verdoso por la producción de pigmento (**piocianina**).

Examen directo. — Es insuficiente para la identificación. Se observan bacilos cortos, móviles, delgados, Gram negativo.

Cultivos. — El color azul verdoso típico (poder cromógeno) asegura el diagnóstico por los cultivos.

INTERPRETACIÓN. — Si se encuentra puro en la sangre (hemocultivo), o en el líquido céfalo-raquídeo es indudable que tiene gran valor etiológico; en asociación con otros gérmenes es necesario ser prudente en la interpretación. Generalmente las supuraciones revisten un carácter benigno por su acción antagónica con los demás microbios debido a la producción de piocianasa.

EXAMEN BACTERIOLOGICO DEL PUS

INFLAMACIÓN

Generalidades. — Las supuraciones, desde el punto de vista práctico, debe considerárselas siempre como de origen microbiano. Son numerosísimos los gérmenes que tienen tendencia a provocar supuraciones, pasando a ser una propiedad común a la gran mayoría de los gérmenes patógenos ("propiedad piógena"). Los más frecuentes son:

a) En las *supuraciones agudas*: Estafilococo, Estreptococo, Bacilo Proteus, Tetrágeno, Piocianico, Neumococo, Enterococo, Gonococo, Meningococo, Bacilo tífico, etc.

b) En las *supuraciones fétidas* se hallan de ordinario gérmenes anaerobios (*B. perfringens* o de Welch, *Bacillus putrificus*, etc.), solos o asociados a aerobios. (Estafilococos, Proteus, etc.).

c) Las *supuraciones subagudas o crónicas* son producidas por el Bacilo de Koch (abscesos fríos) y por ciertos parásitos microscópicos y Hongos (Actinomicosis, Esporotricosis, etc.).

En las supuraciones subagudas o crónicas la presencia de un germen habitualmente piógeno no se opone a la presencia simultánea del bacilo tuberculoso; de ahí que debe tenerse como norma la investigación sistemática en tales casos del bacilo de Koch y de hongos.

Extracción del pus. — Inmediatamente de abierto el foco extraer pus de la profundidad, con ayuda de una pipeta o de una

tórula esterilizada evitando en lo posible la sangre. Si no debe abrirse el absceso, puncionarlo mediante una jeringa premunida de aguja de grueso calibre y previa rigurosa antisepsia de la piel o mucosa.

En la práctica diaria (envío a Laboratorios de Diagnóstico) se envía la misma pipeta que ha servido para extraer, después de cerrar a la llama ambos extremos, o bien verter el contenido de ella o de la jeringa en un tubo estéril, o en una ampollita estéril que se cierra después. Si se usa una tórula irá colocada en tubo o en sobre impermeable esterilizado.

Examen directo. — El examen directo al fresco (sin coloración), es habitualmente inútil (excepción hecha de las supuraciones parasitarias, amebianas, o producidas por ciertos hongos).

El examen directo con coloración es de rigor. Hacer el frotis con cuidado para no deformar las células mediante una laminilla o tarjeta de visita como para los frotis de sangre: delgado y uniforme.

Si el pus presenta granos amarillos, pensar en la Actinomicosis; extraer un grano y romperlo entre lámina y laminilla.

Para la coloración utilizar 2 láminas. Se trata la primera con coloración simple (Tionina fenicada, Azul de toluidina, etc.), que permite evidenciar la presencia de microbios, su morfología, su modo de agruparse, sus relaciones con las células de pus (intra o extra celulares). Observar y anotar igualmente la característica de los elementos histológicos (poli o mononucleares) y su estado (picnosis, cariólisis, degeneraciones, etc.).

La segunda lámina se utilizará para la coloración de Gram, para determinar si los microorganismos toman o no el Gram, lo cual orienta el diagnóstico y facilita la identificación posterior.

Si es necesario se procederá en una tercera lámina a hacer la coloración de Ziehl-Neelsen para la investigación de los gérmenes alcohol y ácido resistentes (*B. de Koch*).

Examen por cultivos. — La técnica difiere según los resultados del "examen directo". Como práctica útil se recomienda sembrar siempre el pus por dilución en placas de agar-sangre para obtener desarrollo rápido aun de los gérmenes más exigentes en medios de cultivo y para apreciar inmediatamente las propiedades hemolíticas de los gérmenes (anginas, osteomielitis, etc.). Si se sos-

pecha la presencia de bacilos de Koch, preparar el pus en la forma habitual (ver Tuberculosis) y sembrar en los medios especiales (Petroff, Dorset, Russell, etc.). Si se piensa en la presencia de hongos, sembrar en medio de Sabouraud. Si se sospecha la presencia de gérmenes anaerobios, sembrar en los medios regenerados especiales, (ver gérmenes de la gangrena gaseosa).

Obtenidos los cultivos y las colonias aisladas, proceder a la identificación mediante cultivos en "medios diferenciales", estudio de las propiedades bio-químicas y serológicas (aglutinación).

Examen por inoculación. — En la práctica se recurre a este método, cuando se sospecha la naturaleza tuberculosa (inoculación al cuy) o neumocócica (laucha pestosa, rata, etc.). Igualmente es útil en las infecciones gangrenosas (anaerobios).

CAPITULO XVIII

ESTREPTOCOCCIAS

GENERALIDADES

El estreptococo se encuentra como saprófito en la superficie de la piel, en las aberturas naturales exteriores (boca, nariz, tubo digestivo, vagina), en la saliva, materias fecales, etc. Los tipos "viridans" y "anhemolíticos" son los más frecuentes en condiciones saprofíticas.

Se los encuentra también en el aire, tierra y aguas estancadas. En los medios exteriores parece perder rápidamente su virulencia.

El papel del Estreptococo en la patología humana es múltiple. Es el agente específico de la erisipela y agente habitual de las infecciones puerperales, flemón difuso, impétigo, septicemias. Se halla a menudo en las anginas simples, en las pleuresías purulentas: flebitis, mastoiditis y meningitis supuradas. Menos frecuente en abscesos simples, pericarditis supuradas, nefritis. Interviene a título de infección sobreagregada en el curso de numerosas enfermedades, especialmente anergizantes.

ASPECTO MICROSCÓPICO

Se presenta en forma de cocos dispuestos en cadenas. Mide de 0,6 a 1 micrón de diámetro en los productos patológicos (sangre, pus). Individualmente, cada coco es muy semejante a los que constituyen los racimos de los Estafilococos pero se diferencian de ellos

por su disposición en cadenas. El tamaño de los cocos varía en los medios de cultivo y aun pueden perder su forma esférica, haciéndose ligeramente ovalados.

Coloración. — Gram positivos.

ASPECTO DE LOS CULTIVOS

Se desarrolla en todos los medios de cultivo ricos en sustancias nutritivas, entre 20 y 46 grados de temperatura; pero lo hace preferentemente en los medios adicionados de suero, sangre, glucosa.

La longitud de las cadenas es mayor (hasta 40 elementos) en los medios de cultivo líquidos que en los productos patológicos y medios sólidos (4 a 6 elementos). Basándose en estas variaciones de las cadenas y de los cocos que la constituyen, en las propiedades anormales que suelen presentar algunos cultivos (no resisten la decoloración en el Gram, licúan la gelatina, etc.) en las diferentes enfermedades a que dan origen, algunos experimentadores sostienen que hay diferentes especies de estreptococos, ("pluralistas"). Otros, por el contrario, sostienen que estas variaciones no tienen nada de específicas. Se pueden provocar en una misma cepa, modificando los medios de cultivo, ("unicistas").

El estreptococo es un anaerobio facultativo. Puede desarrollarse en medios privados de aire, y aun más, se ha logrado aislar, de heridas de guerra, Estreptococos anaerobios estrictos, pero que constituyen especies distintas.

Caldo. — No enturbia el medio. Ya a las seis horas, aparecen copos pequeños que adhieren a las paredes y que más tarde caen al fondo. Si se agita el tubo, estos copos que tienen aspecto de migas de pan, flotan sin enturbiar el medio.

Agua peptonada. — No hay desarrollo por ser un medio pobre en material nutritivo.

Sueros. — En el de caballos y en el de buey hay desarrollo escaso y de aspecto semejante al caldo. En el suero de conejo hay abundante desarrollo.

Leche. — Se desarrolla coagulándola a los 3, 4 días por acidificación. A veces no se produce la coagulación. Nunca hay redisolución del coágulo.

Gelatina. — Da un cultivo escaso sin fluidificar el medio.

Agar. — A las 24 horas se desarrollan colonias blanquecinas, pero transparentes, puntiformes, que se comparan a granos de sémola. Si al agar se agrega sangre, hay un desarrollo más abundante y es posible estudiar el poder hemolítico.

Agar profundo de Veillon. — En este medio, especial para anaerobios, da buen resultado. Las colonias son pequeñas, lenticulares.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades sacarolíticas. — Los Estreptococos fermentan la lactosa, glucosa, levulosa, maltosa y sacarosa sin producir gas.

Acción reductora y proteolítica: negativa.

Acción sobre la sangre: la acción hemolítica es variable y es debida a una estreptolisina que se puede aislar por procedimientos especiales, (Besredka).

La acción hemolítica se observa tanto en el organismo vivo (endocarditis lenta), como también en los medios de cultivo adicionados de unas cuantas gotas de sangre.

Según su acción sobre la sangre, los Estreptococos se han dividido en 3 grupos:

1.—*Hemolíticos*, producen un halo transparente alrededor de la colonia por destrucción de los glóbulos rojos. Entre estos tenemos al "pyogenes", al "sarcaltinae", al "erisipelatis", al "equi" y otros.

2.—*Viridans*, que por oxidación transforma la hemoglobina en metahemoglobina de color verde oliva, virando el color del medio que rodea la colonia del rojo al verde. El E. viridans lo encontramos como el agente más frecuente de la endocarditis ulcerosa y del reumatismo articular agudo.

3.—*Inertes*, por su nula acción sobre la sangre. Los E. inertes se hallan en su mayoría en la boca, faringe e intestinos. Entre ellos tenemos al S. salivarius, S. mitis y otros.

Acción de la bilis. — La presencia de bilis en los caldos de cultivo, impide el desarrollo pero no tiene acción disolvente, (diferencia con el Enterococo y Neumococo).

Toxina. — En los medios de cultivo con estreptococos hay muy poca toxina soluble. La inoculación del filtrado de los medios de cultivo es inocua para los animales de laboratorio.

ACCIÓN PATÓGENA

Conejo. — El procedimiento clásico es la inyección en la base de la oreja. Según la virulencia y el punto de inoculación, las reacciones son distintas. Si la cepa es muy virulenta hay una septicemia mortal en 24 a 48 horas, sin lesión local. Las cepas medianamente activas, que constituyen la mayoría, determinan a las 24 a 48 horas una erisipela típica en la región inoculada. La oreja está tumefacta y colgante, infiltrada de serosidad con *Streptococos*. Hay hipertermia, inapetencia y diarrea. Puede terminar por septicemia y muerte por erisipela flegmonosa o curar sin otra evolución. Las cepas poco virulentas determinan un simple absceso o una ligera rubefacción eritematosa.

Los pasajes exaltan enormemente la virulencia (Marmorek).

Cobayo. — Es poco sensible, reacciona solamente por la inyección de *Streptococos* muy virulentos (abscesos, peritonitis, septicemia, según la vía de inoculación). En general no hay relación entre la virulencia humana y la animal.

Laucha blanca. — Es muy receptiva. La inoculación subcutánea o intraperitoneal provoca la muerte por septicemia a las 24 ó 48 horas, según la virulencia del germen.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Ya que se trata de un germen piógeno, se le buscará en la pus (heridas, abscesos, derrames, líquido céfalo-raquídeo). Una vez hecho el frotis, se hace la coloración de Gram. Se observan cadenas cortas, cocos aislados, intra o extracelulares. La confusión sólo es posible con gérmenes de aspecto semejante, como el neumococo y el enterococo. Se completa el diagnóstico por los cultivos en caldo y agar - sangre, muy fáciles de hacer cuando el estreptococo se encuentra puro en el producto patológico. En caso de septicemia se procederá a hacer un hemocultivo.

Es indispensable que los productos patológicos se siembren siempre en aerobiosis y anaerobiosis por la existencia de coccus que son anaerobios en los primeros cultivos o bien anaerobios estrictos.

En caso contrario, se procederá, previamente, al aislamiento.

Si se trata de una muestra de garganta o de heridas supuradas en que generalmente hay otros gérmenes, es necesario hacer el aislamiento en medios sólidos de preferencia en placas de agar - sangre.

Inoculación. — Los gérmenes virulentos para el hombre, frecuentemente no lo son para los animales de laboratorio. Debido a esta circunstancia, la inoculación experimental no da resultados prácticos.

INTERPRETACIÓN.—La presencia del estreptococo significa infección estreptocócica, cuando el examen directo o los cultivos lo revelan en un organismo o tejido normalmente exento de esta especie microbiana, (supuraciones diversas, septicemia, meningitis, etc.) Aun en estos casos es indispensable estar seguro si el *Streptococo* se halla puro o bien asociado a otros microorganismos.

La presencia del *Streptococo* en productos provenientes de la garganta (angina) y de todas las regiones normalmente habitadas por él, no basta para caracterizar una infección. En espera de mejor criterio, no se afirmará tal diagnóstico sino cuando el estreptococo es muy abundante, tanto al examen directo como en los cultivos (medios sólidos).

(Ver cuadro diferencial con el *Enterococo* y el *Neumococo*).

STREPTOCOCCUS SCARLATINAE

Tiene características de grado que lo diferencian de los demás:

1º *Es hemolítico.*

2º *Produce una toxina soluble.*

3º *Aglutina con los sueros específicos.* Esta última cualidad también se observa en *Streptococos* que no tienen relación con la escarlatina.

Los caracteres morfológicos, de cultivo y propiedades bioquímicas son iguales a los del estreptococo piógeno.

Se toma una muestra del exudado que reviste las amígdalas con una tórula de algodón esterilizada. Se emulsiona en 2-3 c.c. de suero fisiológico estéril y se siembra por agotamiento en placas de agar-sangre. Se las coloca en la estufa a 37 grados. Después de 24 horas de incubación se observan colonias microbianas muy diversas (flora buco-faríngea) entre las cuales se evidencian colonias muy pequeñas, hemolíticas que seguramente corresponden al estreptococo de Dick. Se procede a la identificación por el examen directo.

En los convalecientes, con un fin profiláctico, se repite la siembra hasta tres veces, con intervalo de 8 a 10 días, y si resulta negativa se dará de alta al enfermo con la seguridad que no transmitirá la infección.

REACCIÓN DE DICK:

Es una reacción intra - dérmica - cutánea que sirve para demostrar la existencia o no de la inmunidad para la escarlatina; por lo tanto, la reacción positiva nos indica que el individuo es susceptible de contraerla. Es una reacción de inmunidad no de infección.

Técnica: Se inyecta en el dermis 0,1 a 0,2 c.c. de una dilución de toxina escarlatínosa (1/500 a 1/1000). Al mismo tiempo se inyecta en el otro brazo dilución de toxina inactiva (calentada a 100 grados una o dos horas) como control. Las reacciones positivas al máximo a las 24 horas y se manifiesta por una pápula roja indurada con eritema de la piel en el punto de inoculación que alcanza de medio a dos centímetros de diámetro y que se designa con +, ++, ó +++ según su intensidad. Si la reacción es negativa, a las 24 horas no se observa ninguna alteración de la piel lo mismo que en el control. En los casos de pseudo - reacciones en que el control es positivo, la reacción debe considerarse dudosa porque el individuo reacciona a las proteínas del líquido inoculado.

Si la reacción es negativa (igual al control), nos señala la existencia de antitoxina en la sangre del individuo y, por consiguiente, su resistencia a la infección escarlatínosa.

La prueba de Dick no sirve como medio diagnóstico de la escarlatina.

En la vagina normal o patológica, en las anexitis, afecciones urinarias, en apendicitis, en procesos gangrenosos bucales, del seno, del pulmón, etc., pueden hallarse Estreptococos anaerobios estrictos. Generalmente no son hemolíticos, no fluidifican la gelatina, acidifican la glucosa, levulosa y maltosa; no tienen acción sobre la lactosa, dulcita, glicerina, inulina. Gram positivos. Pueden dividirse en:

a) *Pútridos*. — Comprenden el *S. foetidus* (Veillon), el *S. anaerobius* Navig de largas cadenas; el *S. putridus* Schottmüller productor de gas e hidrógeno sulfurado.

b) *No pútridos*. — No producen ni olor ni gas. Se describe el *S. micros* (cocos muy pequeños) y el *S. intermedius* (Prevost), que es el único de los estreptococos que coagula la leche en masa.

El poder patógeno experimental es escaso o nulo.

CAPITULO XIX

NEUMOCOCO Y ENTEROCOCO

NEUMOCOCO. (*MICROCOCCUS PASTEURII* *DIPLOCOCCUS LANCEOLATUS* DE TALAMON Y FRAENKEL)

GENERALIDADES

Saprófito frecuente de las vías respiratorias superiores: boca, amígdalas, rinofaringe, fosas nasales.

Es el agente específico de la neumonía lobar, hallándose puro en el foco de hepatización y abundante en el desgarro, asociado principalmente al estreptococo piógeno, estafilococo; bacilo de Friedlander, etc. Germen de asociación en las bronconeumonías; agente etiológico de las complicaciones de las infecciones bronco-pulmonares a neumococo donde actúa como germen piógeno (pleuresías, pericarditis, endocarditis, meningitis, nefritis, artritis supuradas, peritonitis, otitis, abscesos, etc.) Estos mismos procesos pueden ser primitivamente a neumococo. Puede, finalmente, producir septicemias (ancianos, niños, alcohólicos, etc.).

ASPECTO MICROSCÓPICO

Cocos que miden de 0,50 a 1 micrón.

En el organismo. — En el desgarro, en la sangre en la pulpa de los órganos, el neumococo se presenta en forma de cocos, algu-

nas veces redondeados, generalmente capsulados, ovalados, y ligeramente afilados en sus extremidades (formas en lanceta, llama de vela, granos de cebada, etc.). Estos cocos se reúnen de a dos formando diplococos.

En los cultivos. — Se observan formas lanceoladas o redondeadas, aisladas o asociadas en diplococos, cadenas cortas de diplococos especialmente en los cultivos en medios líquidos.

Coloración. — Gram positivo; se colorea fácilmente con los derivados básicos de la anilina.

Cápsula. — Posee cápsulas, lo que constituye un importante carácter morfológico y antígeno.

La cápsula es muy visible en los órganos de los animales inoculados, en la sangre, expectoración, pus, etc.

Aparece, también, en los medios de cultivo albuminosos: suero líquido, caldo - sangre, etc.

CULTIVOS

Aerobio facultativo; no se desarrolla en los medios de cultivo corrientes (diferencia con el enterococo). Necesita una ligera alcalinidad. Se desarrolla bien en medios de cultivo albuminosos: agar - sangre, agar - ascitis, caldo - sangre, caldo - suero, caldo - ascitis, suero de conejo, medio MN. (Caldo glucosado con suero de caballo). En los medios sólidos las colonias son pequeñas, "en gotas de rocío". En los medios líquidos hay enturbiamiento homogéneo y sedimentación después de las 48 horas. Antiguamente se usaba de preferencia el medio de Cotoni o medio T (Truche y Cotoni) que es caldo o agar glucosados y peptona Chapoteaux (albumosas y peptonas), los medios antes citados dan desarrollo más abundante.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Fermentación de los azúcares. — Fermenta sin producción de gas, la glucosa, levulosa, sacarosa, maltosa, galactosa y lactosa. La mayor parte de ellos fermenta la **inulina**, carácter que los diferencia de los Estreptococos y Enterococos.

Acción proteolítica. — El neumococo no posee propiedades

proteolíticas; no produce la licuefacción de la gelatina ni del suero coagulado; no redisuelve el coágulo de la leche.

Acción hemolítica. — No produce hemolisis, sino la transformación de la hemoglobina en metahemoglobina que se manifiesta por coloración verdosa alrededor de las colonias en agar - sangre.

Acción de la bilis; fenómeno de Neufeld. — Este autor demostró que la bilis tiene acción disolvente sobre los neumococos; la técnica de la prueba de Neufeld es la siguiente:

Se centrifuga y se emulsiona en suero fisiológico un cultivo de Neumococo en medio MN. A 2 c.c. de esta emulsión, se agrega 2 a 5 gotas de bilis de buey o de conejo; se produce la bacteriolisis a los dos o tres minutos, y el medio se aclara. Este fenómeno sólo lo experimentan los neumococos virulentos. En lugar de la bilis puede obtenerse también la bacteriolisis usando sales biliares del comercio (taurocolato de sodio al 5 por 100).

El fenómeno de Neufeld no aparece jamás con cultivo de estreptococos y enterococos (método diferencial). Los neumococos virulentos son siempre disueltos por la bilis.

Vitalidad. — Es escasa; muere rápidamente en los medios de cultivo debido a su acidificación y a la presencia de aire. Para conservar su vitalidad y virulencia por largo tiempo deben conservarse en sangre de laucha blanca o de conejo, desecada y al vacío.

PNEUMOCOCCIA EXPERIMENTAL

Los animales de laboratorio más sensibles al neumococo son la *laucha blanca* ("reactivo biológico del neumococo") y el *conejo*.

Inoculando intraperitonealmente a la laucha pequeñas cantidades de cultivo o exudados neumocócicos, fallece de 12 a 30 horas por septicemia, obteniéndose el microbio de la sangre al estado puro (diagnóstico bacteriológico).

El conejo muere de uno a tres días por septicemia o por una verdadera neumonía lobar.

Al igual que muchos otros microbios, el neumococo determina lesiones locales en relación inversa a su virulencia.

Formación de anticuerpos. — En el suero sanguíneo del hombre que ha tenido una infección a neumococos y de los animales inoculados con gérmenes vivos o muertos, aparecen propiedades aglutinantes para este microbio. La clasificación serológica de los neumococos en tipos I, II, III y IV o X se funda en las pruebas de aglu-

tinación que son estrictamente específicas para los tipos I, II y III; el tipo IV o X de esta primitiva clasificación comprendía todos los gérmenes que no aglutinan con los sueros anteriores. Los estudios de los últimos años, (Cooper) han demostrado que los neumococos del tipo IV pueden agruparse en 29 tipos serológicos que se designan en los números 4 a 32. El antígeno somático "O" es específico para la especie de neumococos virulentos y avirulentos; la especificidad de tipo de los gérmenes virulentos es debida al polisacárido de la cápsula de los gérmenes virulentos. La diferenciación en "tipos" del neumococo avirulento es imposible. El neumococo avirulento da formas degradadas, formas "R", en las que la pérdida de su capacidad de sintetizar el polisacárido específico, cambia su estructura química y antigénica, y con ella su característica morfológica (**ausencia de cápsula**), de cultivo, (**colonias rugosas**), patógenas (**pérdida de la virulencia**), y serológicas, (**pérdida de la especificidad de tipo**).

INMUNOLOGÍA

Para hacer el diagnóstico del tipo de neumococos se procede en la forma siguiente:

El centrifugado de un cultivo en medio MN de 18 horas, se emulsiona en agua destilada y se reparte en tubitos a la dosis de 1 c.c. para cada tubito. Se agrega el suero aglutinante tipo a la dosis de 1/10, 1/20, 1/50, 1/100, 1/200, etc. Se deja a 37 grados. Si no se observa aglutinación a la media hora, se dejan los tubitos a la estufa a 37 grados durante 24 horas para leer entonces el resultado.

La investigación del tipo serológico tiene importancia en Medicina para la aplicación del suero antineumocócico homólogo.

En los últimos años (Avery y Heidelberger) se ha aislado polisacáridos de las cápsulas, serológicamente específicos, para cada uno de los tipos de neumococos. Estos hidratos de carbono puestos en presencia de los sueros específicos producen una reacción antígeno - anticuerpo de precipitación. Cada tipo de neumococo está caracterizado por un polisacárido con propiedades físicas y químicas propias.

Los distintos polisacáridos son **haptenos**, es decir, que inoculados al estado puro a los animales, son incapaces de producir anticuerpos (antígenos incompletos).

a) *Métodos directos*: (desgarro, pus, líquido céfaloraquídeo, etcétera).

1) **Examen directo** previa coloración. Se concluirá que la infección es neumocócica si la presencia de este germen es abundante y al estado casi puro.

2) **Cultivo**; no es práctico, pues generalmente se dificulta el aislamiento por hallarse asociado a otros gérmenes de fácil desarrollo.

3) **Inoculación**. Por vía intraperitoneal en la laucha blanca que muere por septicemia. Se obtiene cultivos puros a partir de la sangre o del cerebro. Se recomienda lavar previamente el desgarro en suero fisiológico para desembarazarlo lo más posible de los gérmenes de asociación antes de la inoculación.

b) *Métodos indirectos*:

Investigar las **aglutininas** "tipo específico" en el suero de los enfermos colocándolo en presencia de los diversos tipos de neumococos: (aglutinación rápida, lenta, reacción capsular de Neufeld).

Investigar la presencia de **precipitinas** "tipo específico" en filtrados de desgarro o pus por la acción del suero tipo.

REACCIÓN CAPSULAR DE NEUFELD.

(*Quelungsreaction. Reacción de hinchazón o de erupción*). — En un porta-objeto se disponen 3 gotas de suero fisiológico en las que se emulsiona un trocito de producto patológico en estudio. Se agrega una gota de cada uno de los tres sueros I, II, III, no diluidos y se añade a los tres una gota de azul de metileno de Loeffler al 1/5. Mezclar. Cubrir con un cubre-objeto. Examinar con inmersión. Por la acción del suero específico el germen aparece bien visible, cápsula grande, no teñida, bien definida, aspecto vítreo. En las otras gotas no se observa, en cambio, la cápsula que rodea al neumococo también coloreado. Esta prueba puede repetirse igualmente con los sueros 4 a 32 del grupo X.

Esta reacción tiene las ventajas de no necesitar aislar al neumococo de los productos patológicos, posibilidad de emplearlo en cultivos impuros, ahorro de suero, rapidez (minutos) que facilita de inmediato la indicación del suero terapéutico a usar.

Es el polisacárido de la cápsula que al precipitar en presencia del suero tipo específico provoca la reacción de hinchazón.

En el exudado neumónico. — Practicar una punción en el foco hepaticado a través de un espacio intercostal y aspirar un poco de

líquido sanguinolento que servirá para el examen microscópico, los cultivos y las inoculaciones. Se procederá en igual forma para con el jugo pulmonar de los cadáveres.

En la sangre. — Practicar un hemocultivo sembrando 5 a 10 c.c. de sangre en 300 a 400 c.c. del medio MN con líquido ascítico. Un hemocultivo positivo nos indica una infección general.

ENTEROCOCO

GENERALIDADES

El enterococo de Thiercelin es un saprófito normal del organismo, susceptible de hacerse patógeno. Se le encuentra en los individuos sanos en las vías digestivas (boca, faringe, estómago, intestinos, etc.), en la piel, en la vagina, etc.

Virulento, causa trastornos digestivos, invade el organismo para determinar septicemias y localizaciones a distancia (aparato respiratorio, aparato uro-genital, meninges, etc.). Al igual que el estreptococo y el neumococo, actúa como germen piógeno y es causa frecuente de supuraciones, (artritis, uretritis rebeldes, heridas infectadas).

ASPECTO MICROSCÓPICO

Presenta gran polimorfismo. A menudo toma el aspecto del neumococo (diplococos capsulados); a veces de estreptococos a cadenas cortas y aun adquiere forma coco-bacilar. En una misma preparación los elementos son de tamaño muy variable.

Coloración: Gram positivo.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

Se desarrolla fácilmente en todos los medios ordinarios, siendo poco exigente de material nutritivo como de temperatura. Es aerobio facultativo; su temperatura óptima es de 37 grados.

Da un desarrollo abundante en agua peptonada y se desarrolla en gelatina a la temperatura ordinaria. Estos caracteres lo diferencian del neumococo y de los estreptococos.

Se desarrolla en leche coagulándola por fermentación de la lactosa.

En agar forma colonias pequeñas transparentes azuladas.

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Fermentación de los azúcares. — Posee en alto grado propiedades sacarolíticas sin producción de gas. Ataca la glucosa, lactosa, levulosa, galactosa, sacarosa y manita. No fermenta la inulina (diferencia con el neumococo).

Acción proteolítica. — Igual que el neumococo.

Acción hemolítica. — No produce hemolisinas.

Acción de la bilis. — No es lisado por la bilis y, por el contrario, se desarrolla abundantemente en los medios de cultivo adicionados de bilis, (diferencia con el estreptococo y con el neumococo).

Vitalidad. — El enterococo conserva largo tiempo su vitalidad en los medios de cultivo.

ENFERMEDAD EXPERIMENTAL

Gran variación en la virulencia. La laucha blanca es el animal más sensible, pudiendo morir por septicemia a las 24 horas. El conejo, menos sensible, presenta septicemia o formación de abscesos.

Los animales inoculados con cultivos muertos de enterococos suelen sucumbir de una afección caquetizante (toxina termo-estable).

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

En los productos patológicos.

I) El examen directo no permite diferenciarlo del estreptococo ni del neumococo.

II) Los cultivos aerobios y anaerobios facilitan el diagnóstico por los métodos diferenciales ya indicados.

III) La inoculación en la laucha y el conejo determinan la virulencia.

CUADRO DIFERENCIAL

	Estreptococo	Neumococo	Enterococo
<i>Agua peptonada</i>	No hay desarrollo	No hay desarrollo	Desarrollo abund.
<i>Medios biliados</i>	No hay desarrollo	Lisis total (virul.)	Desarrollo abund.
<i>Agar - sangre</i>	Indiferentes Viridans Hemolíticos	Viridans	Indiferentes
<i>Acción de la bilis</i>	No hay lisis.	Lisis total (virul.)	No hay lisis
<i>Resistencia al calor 60° durante ½ hora</i>	Negativa	Negativa	Positiva
<i>Fermentación de la inulina</i>	Negativa	Positiva	Negativa
<i>Fermentación de la manita</i>	Negativa	Negativa	Positiva

GENERALIDADES

Es el agente específico de la blenorragia. Se le encuentra en el pus uretral y vaginal, en los abscesos periuretales, prostatitis, epididimitis, bartolinitis, salpingitis, peritonitis, etc. Se le halla, también, en la rectitis blenorragica y en la oftalmia purulenta del recién nacido.

Produce septicemias, artritis y meningitis.

CAPITULO XX

GONOCOCO Y MENINGOCOCO

Estos dos gérmenes se estudian juntos, porque tienen una serie de caracteres comunes desde el punto de vista bacteriológico. Así, tanto en un pus blenorragico o en líquido céfalo-raquídeo de un enfermo de meningitis cerebro-espinal, se encontrarán microbios libres, o lo que es más frecuente, intracelulares. En el pus blenorragico, el leucocito está invadido de gonococos, (30 a 50); en el líquido céfalo-raquídeo, el meningococo, igualmente intracelular, se halla en menor cantidad. En los dos casos se trata de un microbio en grano de café que se decolora por el método de Gram (Gram negativo).

El gonococo y el meningococo son microbios muy frágiles y sensibles al frío y a la desecación, difíciles, por lo tanto, de cultivar; de ahí que los productos patológicos deban ser sembrados tan pronto hayan sido recogidos y los tubos ser colocados inmediatamente a la estufa. El cultivo es siempre difícil.

Los medios ordinarios no se utilizan, es necesario tener medios ricos en albúminas (sangre, líquido ascítico, etc.).

Por fin, es necesario hacer notar que estos gérmenes son piógenos: el gonococo es especialmente piógeno en la uretra, el meningococo lo es especialmente en las meninges.

Bacteriológicamente sólo se les puede diferenciar mediante las pruebas de fermentación; así, mientras el gonococo fermenta únicamente la glucosa, el meningococo actúa sobre la glucosa y la maltosa.

ASPECTO MICROSCÓPICO

El elemento individual es un coco irregularmente redondeado, de forma arriñonada o en grano de café. En los productos patológicos, frecuentemente están dispuestos de a dos (diplococos) de manera que los elementos acoplados se miran por su cara plana o ligeramente cóncava. En el pus blenorragico corriente es verlos incluidos en las células de pus o en las células epiteliales, sin embargo, suelen encontrarse elementos libres.

En los medios de cultivo, los elementos son desiguales y redondeados u ovalados.

Coloración. — Gram negativo.

ASPECTO DE LOS CULTIVOS

Aerobio que puede desarrollarse en ciertas condiciones, en anaerobiosis. Se desarrolla entre 30 y 39 grados y exige medios especiales a base de albúmina. Las siembras en los medios ordinarios no dan resultado. La humedad y la reacción neutra o ligeramente ácida favorece el desarrollo.

Agar - sangre. — Desarrollo abundante. No produce hemolisis ni forma metahemoglobina.

Agar con líquido ascítico y extracto hepático. — Desarrollo muy abundante: colonias grandes y opacas. Es el medio de elección para preparación de vacunas.

Caldo - sangre. — Igual que caldo - ascítico.

Caldo + líquido ascítico + extracto hepático. — Enturbiamiento, grumos en suspensión a veces velo.

Caldo - ascitis. — A las 48 horas enturbiamiento, después se forma un sedimento grisáceo.

Agar - ascitis. — En estria, a los 2 ó 3 días, da una banda delgada, semitransparente cuya superficie es húmeda y brillante. Las colonias aisladas son puntiformes, blanco - grisáceas, traslúcidas y ligeramente sinuosas. Al cuarto día alcanzan el tamaño de una cabeza de alfiler.

PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS

Acción sobre los azúcares. — Actúa únicamente sobre la glucosa (diagnóstico diferencial con el meningococo que además fermenta la maltosa) sin producción de gas.

No produce indol.

No tiene acción proteolítica.

Vitalidad y resistencia. — Engering ha estudiado la resistencia del gonococo en el agua. Sus investigaciones le han permitido llegar a la conclusión de que según las cepas la resistencia de los gérmenes en el agua estéril o en el agua de las piscinas puede mantenerse durante 2,30 hs. a 14 horas.

En la orina puede sobrevivir durante 24 horas. En las esponjas que quedan húmedas igualmente se mantienen vivos 24 horas, (peligro de contaminación, vulvo - vaginitis de las niñas).

Acción de los agentes químicos.

Substancia química	Título	Resistencia
Nitrato de Ag.	1 p. 1000	5 minutos
Protargol	0,5 p. 1000	10 minutos
Sublimado	1 p. 1000	20 minutos
Oxocianuro de Hg.	1 p. 1000	5 minutos
Permanganato de potasio	1 p. 1000	Acción incompleta en 1/2 hr.

ENFERMEDAD EXPERIMENTAL

Los animales son poco sensibles al gonococo.

Las inoculaciones subcutáneas y uretral son inofensivas para el conejo, perro, caballo y mono. La inyección intravenosa de cultivos gonocócicos en el conejo y en el cuy, le provocan la muerte por intoxicación (endotoxina).

Las uretritis y conjuntivitis que se han logrado producir en algunos animales son también debidas a las endotoxinas; lo prueba el hecho de haber obtenido idénticos resultados con la inoculación de cultivos muertos.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

En la infección aguda y subaguda.

a) *Examen microscópico del pus.*

I) **Pus uretral, conjuntival, rectal y meníngeo.** — Debe hacerse los frotis sin comprimir para evitar la destrucción de las células de pus que dejarían en libertad los gérmenes intracelulares. No enviar nunca a un laboratorio una gota de pus entre dos láminas. La mejor técnica es la utilizada para los frotis de sangre con una laminilla o tarjeta de visita.

Coloración. — Hacer una coloración simple con azul de metileno o tionina y una coloración doble de Gram. La presencia de diplococos intracelulares. Gram negativos basta para precisar el diagnóstico de uretritis gonocócica.

II) **Pus genital en la mujer.** — Salvo en los casos de vulvo - vaginitis de las niñas, donde se impone la técnica de la extracción del pus a nivel de la vulva o de la vagina, es preciso estudiar la secreción purulenta de la uretra o del cuello uterino donde los gonococos se hallan en más abundancia. Igual cosa respecto de los folículos y de las glándulas de Bartolino. La certeza sólo se obtiene por la identificación mediante los cultivos.

b) *Cultivos.*

Se utilizan más que para hacer el diagnóstico, para obtener un desarrollo abundante de gonococos y preparar autovacunas. Se usarán medios mejorados (agar - ascitis) y se harán de preferencia

en el mismo laboratorio para colocar los tubos a la estufa inmediatamente.

En la blenorragia crónica.

El gonococo se hace más y más raro a medida que la afección tiende a la cronicidad, hasta parecer bacteriológica y aun clínicamente curada. Sin embargo, las contaminaciones y las recidivas vienen a comprobar lo contrario (gonococcismo latente).

Gota matinal.— En la uretritis crónica el pus no aparece sino en la mañana, y es el que debemos aprovechar para sembrar y hacer frotis. Es frecuente en tales casos no encontrar el gonococo o bien encontrarlo mezclado con otros gérmenes de asociación (B. cutis communi. Estafilococo. Tetrágeno, etc.).

Para la investigación bacteriológica se procede a obtener cultivos con el siguiente método:

Reactivación.— Es la primera fase de la investigación de la blenorragia latente. El método más antiguo consiste en la ingestión de cerveza; el masaje de la próstata y las instilaciones uretrales con nitrato de plata son otros métodos que suelen utilizarse. Si con esta reactivación hay secreción uretral, se procede al examen directo y a los cultivos. Si no hay secreción uretral, se procede a hacer orinar en un vaso esterilizado, centrifugar inmediatamente y hacer un examen directo y cultivos con ese centrifugado.

Examen del líquido articular.— Sembrar directamente en agar - ascitis o en caldo - ascitis. Los resultados son frecuentemente positivos si se tiene la precaución de sembrar abundantemente (0,5 a 1 cc.).

Espermocultivos.— Si los procedimientos anteriores fracasan o si se sospecha la existencia de gonococos en las glándulas anexas, se hará el examen bacteriológico del líquido espermático eyaculado.

TECNICA:

- 1) El enfermo es reactivado.
- 2) Debe venir al laboratorio, habiendo evitado orinar 5 a 6 horas antes del examen.
- 3) Limpieza rigurosa del glande con suero fisiológico estéril. Examen directo y cultivos de la gota matinal.

4) Con el máximo de asepsia recoger la totalidad del líquido espermático en una placa de Petri esterilizada y mantenida a 37 grados.

5) El producto eyaculado se deja fluidificar durante 10 ó 15 minutos en la estufa a 37 grados.

6) Practicar las siembras:

a) Algunas gotas en agar - ascitis.

b) Alguna gotas en agar - sangre.

c) El resto del esperma sembrarlo en un medio líquido (caldo-ascitis).

7) Proceder a la identificación del germen si hay cultivos positivos 48 ó más horas después de la siembra.

3) En la septicemia y artritis gonocócicas.

En las septicemias.

Se hace hemocultivo con 10 c.c. de sangre en 300 - 400 c.c. de caldo - ascitis. Diariamente se examina el matraz y se siembra en medios sólidos (agar - ascitis) para comprobar la presencia y proceder a la investigación del gonococo. Recordar que el desarrollo es, a veces, tardío (3 a 5 días).

En las artritis.

Fijación del complemento.— La reacción de Bordet-Gengou aplicada a la fijación de los anticuerpos gonocócicos (**gono-reacción**) puede suministrar 100 p. 100 de reacciones positivas en ciertas manifestaciones gonocócicas (artritis, orquí - epididimitis, afecciones ginecológicas, etc.). Es preciso emplear como antígeno una mezcla de varias cepas de gonococos cultivadas durante 24 horas en agar - ascitis, emulsionadas en agua fisiológica al 8,5 por 1000, calentadas durante 1 hora a 60 grados y conservadas en ampollitas cerradas.

Las reacciones positivas persisten generalmente durante o semanas después de la curación clínica; una mayor persistencia sugiere la idea de la existencia de un foco gonocócico aun activo.

Es preciso tener presente que la vacunoterapia provoca la formación de la sensibilizadora gonocócica que aparece a los 12 días de iniciado el tratamiento.

MENINGOCOCO

GENERALIDADES

El Meningococo de Weichselbaum es el agente específico de la meningitis cerebro - espinal epidémica y se le halla en el exudado meníngeo y en el líquido céfalo raquídeo. En los portadores sanos se le encuentra en la rinofaringe.

ASPECTO MICROSCÓPICO

En los productos patológicos se presenta en disposición muy análoga a la adoptada por los Gonococos (diplococos en grano de café, mirándose por su cara cóncava y con predominio intracelular). En los cultivos se encuentran elementos aislados, diplococos, tétradas, algunas veces en pequeños grupos y con frecuencia verdaderas formas gigantes (formas de involución).

Coloración. — Gram negativos.

ASPECTO DE LOS CULTIVOS

Aerobio estricto. Al igual que el Gonococo, no se cultiva en los medios ordinarios y exige medios albuminosos, de preferencia albúmina humana, por lo menos en las primeras generaciones.

Caldo ascitis. — Enturbiamiento con sedimentación.

Agar ascitis. — Desarrollo idéntico al gonococo.

Disociación microbiana. — Enders ha logrado obtener a partir de un cultivo puro y por traspasos repetidos en agar - sangre desfibrinada de conejo, dos formas básicas de colonias, lo que constituye un nuevo ejemplo de disociación microbiana en colonias "S" y "R".

La variante "R" produce colonias con granulaciones, de superficie arrugada y bordes ligeramente desiguales que están en marcado contraste con la suavidad de la superficie de la variante "S". Morfológicamente la forma "R" es un poco más grande que la forma "S" y muestra una tendencia a agruparse en tétradas; hay también diferencia en el tipo de crecimiento en medios líquidos, mientras que

las reacciones fermentativas de los azúcares son en ambas variantes cualitativamente las mismas. Las pruebas de adsorción con sueros aglutinantes "anti-R" y "anti-S" indican una estructura antigénica más compleja para la forma "S" que para la forma "R".

PROPIEDADES BIO - QUÍMICAS

Acción sobre los azúcares. — El meningococo, a cualquier tipo que pertenezca (A. B. C. o D.), descompone la glucosa y maltosa sin producción de gas. Sobre los demás azúcares no actúa.

Vitalidad y resistencia. — Una característica de los meningococos es la escasa resistencia a las temperaturas bajas. Ya a las 6 - 8 horas pueden los cultivos hacerse estériles si en lugar de mantenerlos a 37 grados se los abandona a la temperatura ordinaria o en la hielera.

Los cultivos precisa mantenerlos en la estufa y repicarlos cada 3 días (recién aislados), y posteriormente cada semana.

ENFERMEDAD EXPERIMENTAL

En general, es poco patógeno para los animales.

La laucha es el más receptivo, sucumbe por inoculación intraperitoneal de grandes cantidades de cultivo. Peritonitis franca a la autopsia, cuyo líquido contiene numerosos gérmenes.

Menos receptivos son *el cuy* y *el conejo*; sin embargo, las inoculaciones masivas por vía venosa o peritoneal los mata por intoxicación, más que por infección.

En *el macaco*, mediante inoculación raquídea se ha conseguido provocar una verdadera meningitis mortal.

VARIETADES DE MENINGOCOCOS

Se ha podido demostrar la existencia de variedades de meningococos cuyos caracteres morfológicos y propiedades fermentativas son análogas a las del Meningococo de Weichselbaum. Sólo se diferencian de éste y ellas entre sí, por las pruebas de aglutinación;

de tal manera que los sueros procedentes de individuos enfermos de meningitis cerebro - espinal, aglutinan al meningococo del tipo causante de la enfermedad. Son antígenos distintos.

La clasificación de Nicolle y Jouan es la siguiente:

Tipo A. Muy frecuente y que corresponde al Meningococo de Weichselbaum.

Tipo B. Más frecuente.

Tipos C. y D. Muy raros.

La diferenciación de estos tipos tiene un alto interés práctico: los sueros preparados con los diferentes meningococos y el suero de los enfermos no poseen propiedades aglutinantes más que para el microbio del tipo correspondiente. El estudio del tipo de meningococo es indispensable, pues los sueros terapéuticos son específicos.

PRECIPITACION.

Se emulsiona un cultivo en medio sólido en suero fisiológico, abandonándolo 24 horas a la temperatura ordinaria para centrifugarlo después. Se vierte en un tubo 20 gotas del líquido claro obtenido (*extracto autolítico*) y 1 gota de suero anti - meningocócico no calentado y homólogo al meningococo que ha suministrado el antígeno A. B. C. o D. Se forma pronto un precipitado abundante que se deposita en el fondo del tubo. Los caracteres de la precipitación están calcados sobre los de la aglutinación.

Es importante retener que si a veces hay irregularidades, tanto en la aglutinación como en la precipitación, ello es debido a la presencia de coagulininas y co-precipitinas en los sueros heterólogos. Sin embargo, las pruebas de "saturación" de las aglutininas y de las precipitinas, permiten definir la naturaleza específica y separar el grupo para las necesidades de la práctica médica.

PSEUDO - MENINGOCOCOS

Son un grupo de gérmenes que suelen encontrarse en la rinofaringe y capaces de producir meningitis y rinofaringitis y que por ser Gram negativos y poseer caracteres morfológicos parecidos a los meningococos, pueden ser confundidos con éstos. Sin embargo, el diagnóstico diferencial es fácil por los caracteres siguientes:

- 1) *Diferentes propiedades fermentativas.*
- 2) *Se cultivan fácilmente en los medios ordinarios.*
- 3) *Ninguno de ellos es aglutinado por los sueros anti-meningocócicos.*

Micrococcus catarrhalis (neisseria catarrhalis).—No tiene propiedades fermentativas. Puede producir meningitis y septicemias.

Neisseria pharyngis cinereus. — No fermenta ningún azúcar.

Neisseria pharyngis flavus I. —Fermenta la glucosa, la maltosa y la levulosa. Produce pigmento amarillo.

Neisseria pharyngis flavus II. —Fermenta la glucosa, la maltosa y la levulosa. Produce un pigmento amarillo.

Neisseria pharyngis flavus III. — Fermenta la glucosa y la maltosa. Da coloración amarilla intensa.

Neisseria pharyngis siccus. —Fermenta la glucosa, la levulosa y la maltosa. Colonias secas.

Diplococcus crassus (neisseria crassus). — Fermenta la glucosa, la maltosa, la galactosa, la lactosa, la sacarosa. Gram positivo. (Puede producir meningitis purulentas a consecuencia de traumatismos craneales).

FORMACIÓN DE ÁCIDOS EN AGAR-SUERO + TORNASOL Y AZÚCAR

G E R M E N	Glucosa	Maltosa	Levulosa
N. gonorrhoeae	+	—	—
N. meningitidis (A. B. C. D)	+	+	—
N. crassus	+	+	+
N. catarrhalis	—	—	—
N. pharyngis siccus	+	+	+
N. pharyngis cinereus	—	—	—
N. pharyngis flavus I	+	+	+
N. pharyngis flavus II	+	+	+
N. pharyngis flavus III	+	+	—

Debido a que poseen iguales propiedades fermentativas puede confundirse con el meningococo *N. pharyngis flavus* III, pero este último germen se distingue fácilmente por la producción de pigmento amarillo.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

1) En la meningitis cerebro - espinal.

Se centrifuga 15 a 20 minutos el líquido céfalo - raquídeo extraído asépticamente. El centrifugado servirá para el examen directo y los cultivos.

a) *Examen directo.* — Se observará la presencia de células epiteliales y polinucleares alterados. En los espacios libres o en el interior de las células se buscarán los diplococos Gram negativos. Este examen permitirá distinguir fácilmente los gérmenes frecuentes de las meningitis agudas, la mayoría de los cuales toman el Gram, (neumococos, estreptococos y *diplococcus crassus*).

b) *Cultivos.* — Se harán de inmediato, pues los gérmenes mueren a la temperatura ordinaria. Son indispensables para proceder al diagnóstico de certidumbre y obtener mediante los sueros aglutinantes el tipo específico. Se utilizará el agar - ascitis o el agar - sangre inclinados o en placa de Petri. Si hay desarrollo se procede a la investigación.

2) En los portadores.

Se extraerá una muestra a nivel de las amígdalas palatinas y del mucus nasal. El examen directo es insuficiente y solamente los cultivos y la identificación posterior aseguran el diagnóstico. Los cultivos se harán por agotamiento en placas de Petri con agar - ascitis o agar - sangre.

3) En la infección generalizada.

En el momento de los calofríos o cuando la temperatura está vecina a su acmé, proceder a un hemocultivo en caldo - ascitis con extracto hepático. Repicar en agar - ascitis o en agar - sangre inclinados e identificar los gérmenes si hay desarrollo.

Identificación. — Las investigaciones precedentes deben ser completadas por las pruebas de identificación:

- 1) *Prueba de las fermentaciones de los azúcares,* (diferencia con el gonococo y los pseudo - meningococos).
- 2) *Prueba de la aglutinación,* (identificación de tipo).

EXPERIENCIAS

I.—*Bacteriolisis. (Prueba del peritoneo del Dopter):*

Inyectar en el peritoneo de varios cuyes 0,5 c.c. de suero normal y 0,5 de suero anti - A. Inocular 24 horas después 1 c.c. de emulsión de un cultivo del Tipo A (un tubo de agar en 6 c.c. de agua fisiológica). Extraer el exudado peritoneal cada cinco minutos, extenderlo sobre láminas y colorearlo con tionina fénica para el examen microscópico.

Se observará: 1º Cuyes testigos que no han recibido sino la emulsión microbiana se observará una gran cantidad de meningococos; los leucocitos sólo comienzan a llegar a la sexta hora.

2º Cuyes que han recibido previamente suero normal presentarán una evolución más rápida; los leucocitos aparecerán a la segunda o tercera hora y los meningococos, muy numerosos hasta entonces, desaparecerán.

3º Los cuyes inyectados con el suero antimeningocócico presentarán una fagocitosis intensa que no dura sino 5 a 10 minutos. La hiperleucocitosis es la regla y los meningococos sufren una lisis progresiva al mismo tiempo que la fagocitosis es intensa a nivel del epliplón. Veinte minutos después de la inyección microbiana el examen no nos revela sino escasos linfocitos y la desaparición de los gérmenes es completa.

II.—*Prueba de la vena:*

Si se inyecta en la vena yugular de un cuy de 250 a 300 grs. de peso una mezcla de suero antimeningocócico no calentado (1 c.c.) y una emulsión de meningococos del tipo correspondiente (1,5 c.c.), se determina en el animal trastornos inmediatos que recuerdan los síndromas anafilácticos. Es la rápida lisis la causante del trastorno.

CAPITULO XXI

BACILOS HEMOGLOBINOFILOS

Son gérmenes que tienen la propiedad de cultivarse solamente en los medios que contienen sangre; se creyó que el elemento indispensable para su desarrollo fuera la hemoglobina, pero se comprobó que en realidad era indispensable un extracto globular independiente de la hemoglobina.

A este grupo de gérmenes pertenece:

El **B. de Pfeiffer**, considerado en un tiempo como agente de la influenza.

El **B. de Bordet - Gengou**, que es agente específico de la coqueluche.

El **B. de Ducrey**, agente etiológico del chancro blando.

BACILO DE PFEIFFER

Descubierto por Pfeiffer en 1890 en la rino-faringe de los enfermos de influenza. Bacilo pequeño, Gram negativo, difícil de teñir y que sólo se cultiva en los medios que contienen sangre. Pfeiffer lo consideró como agente específico de la influenza porque no se encuentra en los esputos de individuos sanos y porque consiguió reproducir experimentalmente, en los monos, una enfermedad comparable a la gripe humana. Por las investigaciones de Ch. Nicolle y otros se ha demostrado que el agente de la gripe es un virus filtrable y que este germen sólo interviene como microbio de asociación, "de sortie". En los enfermos de gripe se le encuentra

MORFOLOGÍA

Es un bacilo muy pequeño, de 1 a 2 micrones, de extremos redondeados, inmóvil, aislado o en cadenas de dos a cuatro elementos, sin cápsulas ni esporas. Es poliformo: en los productos patológicos se encuentran formas ovoideas, con coloración bipolar; en los cultivos hay formas filamentosas y formas de involución (hinchadas, ovaladas o en forma de maza). Es Gram negativo, difícil de teñir, se recomienda hacer actuar la fucsina diluida durante 10 minutos, el azul de metileno o la tionina fenicada en caliente.

En los productos patológicos puede ser intra o extracelular.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

El bacilo de Pfeiffer no se desarrolla en los medios corrientes de cultivo, necesita medios mejorados a base de sangre, de hemoglobina o de extractos globulares. Temperatura óptima: 37 grados. A las 24 ó 48 horas los cultivos presentan colonias pequeñas con aspectos de gotas de rocío. También se desarrolla en caldo con sangre humana o de conejo, los cultivos en este medio se enturbian y aparecen copos blanquecinos. Se ha observado que el estafilococo tiene una acción favorecedora sobre los cultivos de bacilos de Pfeiffer porque facilitan su desarrollo. Al lado de las colonias de estafilococos el bacilo de Pfeiffer presenta colonias mucho más grandes que en los cultivos puros, (colonias satélites). El colibacilo, el bacilo de Eberth y el bacilo de la difteria tienen también acción favorecedora aunque menos pronunciada. Estos fenómenos pueden comprobarse experimentalmente (estimulación).

Toxina. — Los cultivos muertos por el calor son tóxicos, (endotoxina).

Aglutinación. — El suero normal humano y de los animales aglutina al bacilo de Pfeiffer al 1 x 10 ó 1 x 20; esta propiedad aglutinante no aumenta en los convalecientes de influenza o en los portadores de gérmenes. El suero de los animales inmunizados aglutina a diluciones al 1 x 200 y al 1 x 500.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

El bacilo de Pfeiffer debe investigarse en los esputos y en los exudados (faríngeo, pleurítico, meníngeo y articulares) y también en la sangre en los individuos enfermos de influenza.

Al **examen directo** de los productos patológicos se presenta como un bacilo Gram negativo, polimorfo, bacilos delgados, cocobacilos, formas ovoideas que se tiñen en forma bipolar.

Los **cultivos** se hacen, de preferencia, en agar - sangre.

BACILO DE BORDET - GENGOU

Es el agente de la coqueluche y es responsable de las complicaciones de esta misma enfermedad (bronconeumonía, pleuresía).

MORFOLOGÍA

Es un bacilo pequeño, a veces cocobacilar, en diplobacilos, Gram negativo y se tiñe en forma bipolar. En los exudados puede ser intra o extracelular.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

Como el bacilo de Pfeiffer, necesita para su desarrollo medios con sangre. Para los primeros cultivos, Bordet y Gengou aconsejan utilizar un medio compuesto de agar, papa y sangre (medio de Bordet - Gengou). El desarrollo aparece a las 48 horas en forma de colonias pequeñas, blancas y prominentes; en caldo - sangre y caldo - suero produce un ligero enturbiamiento y un depósito viscoso después de algunos días.

Toxina. — No produce exotoxina. Se ha conseguido aislar una endotoxina tan activa como los cultivos vivos, y que tiene propiedades necrosantes (inoculación subcutánea de 0,2 c.c. al cuy).

Aglutinación. — El bacilo de Bordet - Gengou es aglutinado intensamente por el suero de caballo inmunizado. En los enfermos de coqueluche las propiedades aglutinantes aparecen tardíamente, se observan sólo en la convalecencia. La sangre o suero humano normal nunca aglutina al bacilo de Bordet - Gengou.

Fijación del complemento. — El bacilo de Bordet - Gengou fija el complemento en presencia de suero de animales inmunizados y también con el suero de los enfermos de coqueluche. La reacción de fijación es mucho más constante que la de aglutinación en la sangre de los enfermos; se observa en todos los casos y por medio de ella se puede establecer el diagnóstico de la coqueluche larvada o

de las formas en que faltan los síntomas característicos. La reacción es positiva después de la segunda semana o más tardíamente y persiste durante uno o dos años.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Cultivo. — El bacilo de Bordet - Gengou no puede evidenciarse sino en el primer período de la enfermedad, pues más tarde es difícil aislarlo por la presencia de numerosos gérmenes de asociación. Para obtener cultivos se coloca delante de la boca del enfermo (20 a 25 centímetros), una placa de Petri con medio de Bordet - Gengou, en el momento de un acceso de tos. Tapar la placa y llevar a la estufa a 37°. Observar a las 24, 48 y 76 horas. La identificación se hace por los caracteres de los cultivos, el aspecto microscópico del bacilo y por aglutinación y fijación del complemento en presencia del suero experimental. Estas últimas pruebas lo diferencian del bacilo de Pfeiffer que tiene muchos caracteres comunes con el bacilo de Bordet - Gengou.

BACILO DE DUCREY O BACILO DEL CHANCRO BLANDO

El Bacilo de Ducrey fué descubierto en 1889, por este autor y es el agente específico del chancro blando. Se encuentra en el pus del chancro blando asociado a diversos microbios: estafilococo, tetrágono, etc.; y al estado puro en el pus del bubón chancroloso, del que pueden obtenerse cultivos.

MORFOLOGÍA

Es un bacilo de 1,5 a 2 micrones de largo, de extremos redondeados. En el pus se encuentra aislado o en cadenas cortas o largas. Puede ser intra o extracelular. En los cultivos se encuentra en formas aisladas, en grupos o en cortas cadenas. Es un germen Gram negativo y se tiñe en forma bipolar.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

No se desarrolla en los medios corrientes de cultivos. El medio más favorable es el agar - sangre de conejo. Temperatura óptima, 37°. Las colonias son redondeadas, prominentes, brillantes y alcanzan su desarrollo máximo a las 48 horas.

Vitalidad y virulencia. — En el pus de los chancros al abrigo del aire conserva su virulencia durante bastante tiempo (hasta 17 días), igualmente se conserva en la orina, agua, etc. La desecación a la temperatura ordinaria hace disminuir la virulencia en 24 a 36 horas. Las temperaturas de menos de 16 grados no ejercen efecto sobre la virulencia. El bacilo muere rápidamente por la acción de los antisépticos débiles, por las bases y por los ácidos. En los cultivos en agar - sangre el bacilo conserva su virulencia y su vitalidad durante bastante tiempo; los cultivos sucesivos conservados a 37 grados durante tres semanas dan resultados positivos; además, después de once generaciones en agar - sangre es susceptible de producir el chancro experimental en el hombre.

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Hombre. — El pus chancreoloso y los cultivos, inoculados al hombre reproducen el chancro blando típico; basta para ello una simple excoriación del tegumento. La lesión, que aparece ya a las 24 horas, toma el aspecto característico a los 4 ó 6 días. Puede reproducirse indefinidamente: no confiere inmunidad.

Animales. — No es patógeno para ningún animal, con excepción del mono que es receptivo. Inhibiendo la fagocitosis (ácido láctico) puede exaltarse la virulencia para el cuy por vía peritoneal.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Indicaciones. — En presencia de una ulceración chancreolosa genital o paragenital, acompañada de un bubón ulcerado o no.

1º) *Examen directo.* — Evitando hacer sangrar, se limpia cuidadosamente la superficie del chancro, para eliminar parte de los gérmenes de asociación. Escarificar el borde con el asa de platino y hacer frotis y coloraciones.

2º) *Cultivo.* — El diagnóstico por cultivo es difícil por la presencia de gérmenes de asociación. Se puede partir de un "bubón cerrado" mediante punción: de un "bubón abierto" extrayendo con pipeta estéril o jeringa el pus de profundidad; del "chancro simple" o del "chancro de reinoculación". Sembrar en agar sangre. Observar el aspecto de las colonias y especialmente buscar las largas cadenas en el líquido de condensación.

3º) *Reinoculación.* — Hacer una escarificación con una lanceta

en la región deltoidea del enfermo. Cubrir con un vidrio de reloj y observar. Verificar la presencia del bacilo y destruir el chancro formado mediante un termocauterio.

4º) *Intradermo-reacción de Ito-Reenstierna.* — Se utiliza como antígeno un cultivo de B. de Ducrey muertos por el calor. La reacción alérgica es positiva cuando aparece en el punto de inoculación una pápula rodeada de una zona eritematosa.

La reacción es específica, constante y permite un diagnóstico retrospectivo aun diez años después. (Diferencia con las reacciones tuberculínicas). La inoculación de **estreptobacilina** provoca una reacción débil en los que tienen un chancro blando de 8 ó 10 días de evolución. Se hace más viva cuando se propaga a los ganglios.

5º) *Fijación del complemento.* — Se hace evidente ya a los 8 días de aparecido el chancro y puede persistir dos o tres años.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.—La presencia de los bacilos en el examen directo asegura el diagnóstico. Su ausencia no permite rechazarlo. (Repetir los exámenes).

La presencia de B. de Ducrey no debe hacer rechazar en forma absoluta la sífilis, pues es posible la existencia de "chancros mixtos". Hacer el examen ultramicroscópico (sífilis).

Se diferenciará del B. de Yersin (bubón) por el fácil desarrollo del bacilo pestoso en los medios corrientes.

CAPITULO XXII

MICROBIOS DE LAS CONJUNTIVITIS

Los microbios corrientes de la supuración pueden encontrarse en las conjuntivitis (estafilococos, estreptococos, neumococos, gonococos, etc.), pero, además deben estudiarse ciertos gérmenes que tienen como característica su predilección ocular ("virulencia electiva").

BACILO DE WEEKS

GENERALIDADES

Es el microbio específico de la "conjuntivitis aguda contagiosa". Presenta una gran analogía con el bacilo de Pfeiffer tanto en sus caracteres morfológicos como de cultivo y bioquímicos.

ASPECTO MICROSCÓPICO

Bacilo fino, corto, aislado o en diplobacilo sin cápsulas ni esporas e inmóvil. En el exudado se encuentra extracelular o incluido en los leucocitos polinucleares. No toma la coloración de Gram.

CULTIVOS

No se desarrolla en los medios ordinarios. Es un aerobio estricto. Los medios especiales más favorables son aquellos que contienen sangre o extractos sanguíneos. (Mayores detalles ver en B. de Pfeiffer).

PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Ningún poder proteolítico. La aglutinación y saturación de aglutininas revelan pluralidad de razas de bacilos de Weeks.

PODER PATÓGENO

Ninguna especie animal es sensible al bacilo de la conjuntivitis aguda ni siquiera es virulento para los monos. En el hombre la lesión específica se reproduce con cultivos puros. La individualidad del bacilo de Weeks está constituida por su adaptación a la conjuntiva humana sobre la cual el bacilo de Pfeiffer carece de acción. Ningún otro carácter, ni bioquímico, ni cultural, ni morfológico permite diferenciar ambas especies microbianas.

BACILO DE MORAX - AXENFELD

Es el agente patógeno de una inflamación subaguda de la conjuntiva y que se distingue por su localización en el ángulo ocular "conjuntivitis angular".

En los frotis de lágrimas o de exudado conjuntival, el germen se presenta bajo la forma de gruesos bacilos cortos, a menudo dispuestos en diplobacilos y con extremidades redondeadas. Es Gram negativo, inmóvil y no esporulado.

Los cultivos sólo se obtienen en medios albuminosos que contengan sangre, suero o líquido ascítico. Se desarrollan sobre el suero coagulado que es licuado lentamente por sus colonias.

El cultivo reproduce la conjuntivitis subaguda diplobacilar, pero no es virulento para los animales de laboratorio ni para los monos.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO DE LAS CONJUNTIVITIS

En la práctica diaria es suficiente el examen directo con coloración (una coloración simple para el estudio de las relaciones microbio - celulares, y una coloración doble de Gram para completar la identificación). La interpretación diagnóstica se hará siempre que el germen se halle puro o en gran abundancia.

El diagnóstico por cultivo permite asegurar y confirmar el examen anterior.

CAPITULO XXIII

DIFTERIA

GRUPO CORYNEBACTERIUM

Son bacilos inmóviles, Gram positivos, caracterizados por la presencia de granulaciones intraprotoplasmáticas, por la dilatación de sus extremidades que dan el aspecto de masas y por la propiedad de dar formas ramificadas en los cultivos viejos.

Las principales especies que comprende este grupo, son:

- Bacilo de la difteria** (*Corynebacterium diphtheriae*).
- B. pseudodiftérico de Hoffman** (*Corynebacterium communi*).
- B. cuti communi** (*Corynebacterium cutis*).
- B. de la xerosis** (*Corynebacterium xerosis*).

C. DIPHTERIAE (B. DE KLEBS-LOEFFLER)

El bacilo de Loeffler se encuentra:

- 1º En las falsas membranas de la difteria humana (angina diftérica, crup, difterias nasal y cutánea, etc.).
- 2º En la boca y en las fosas nasales de los convalecientes.
- 3º En la boca de las personas sanas que han estado en contacto de los enfermos (portadores sanos).

4º En la piel y en las mucosas de los bovinos (vacas) formando vesículas y úlceras. Constituyen una fuente de contagio.

5º Puede conservar su vitalidad bastante tiempo en el polvo de las habitaciones o en los objetos y ropas que han estado en contacto con los enfermos.

CARACTERES MORFOLÓGICOS

El bacilo de Loeffler rara vez se encuentra puro en las falsas membranas. Con frecuencia los microbios que lo acompañan están en pequeño número y sin importancia patológica. A veces, sin embargo, al lado del bacilo diftérico se halla un número considerable de ciertas especies bacterianas que influyen en la gravedad de la difteria, ensombreciendo el pronóstico. Los más frecuentes son:

El estreptococo, cuya asociación constituye la "estrepto - difteria", que acentúa considerablemente el cuadro tóxico.

El estafilococo, menos grave que el anterior (Flegmones).

El colibacilo, más raro, pero grave.

El coccus de Brissou, de pronóstico benigno.

Aspecto microscópico. — Es un bastón recto o ligeramente curvo muy polimorfo. Extremidades redondeadas y a veces ensanchadas. Sus dimensiones son muy variables y, a este respecto se distinguen tres variedades: *B. cortos* (2 micrones), son casi cocos dispuestos paralelamente en grupos de dos o más; raros en los diftéricos, más frecuentes en los portadores. *B. medianos* (3 a 4 micrones) y *bacilos largos* (4 a 5 micrones), generalmente dispuestos en empalizada o bien por sus extremidades formando una V; son los más frecuentes en las anginas diftéricas y los más toxígenos. No producen esporas. Son inmóviles.

En los cultivos antiguos y en las membranas se observan **formas de involución**: formas de pera, de raquetas, de masas, granulados, a veces ramificados.

Coloración. — Se colorea fácilmente con los colores básicos de la anilina.

Toma el Gram a condición de que el tiempo de decoloración no se prolongue demasiado.

Corpúsculos metacromáticos. — Son granulaciones intraprotoplasmáticas que se disponen generalmente en las extremidades del bacilo (**corpúsculos polares**) y que se tiñen de distinto modo que el protoplasma (**corpúsculos metacromáticos de Babés**).

Hoy no se consideran característicos del B. diftérico, porque hay cepas que no los presentan y, además, se han identificado en los bacilos difteromorfos.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

La temperatura óptima del cultivo es 37 grados.

Es un anaerobio facultativo, pero se desarrolla mejor en presencia del aire.

Los medios neutros o ligeramente alcalinos son los más convenientes. Ph. óptimo: 7.3 a 7.6.

Caldo Martín. — Se utiliza de preferencia para la preparación de toxina. Crece mejor que en otros medios líquidos. Ya a las 12 ó 24 horas forma en la superficie un velo muy tenue, que luego se espesa y cae formando un sedimento blanquecino en el fondo. El velo se regenera por segunda y a veces por tercera vez. El caldo permanece transparente.

Se consigue un cultivo más abundante haciendo pasar una corriente de aire por la superficie del medio (matraces de Fernbach).

En los primeros días se desarrolla en los cultivos en caldo, una acidez pronunciada que luego desaparece y el medio toma una reacción alcalina. Esta acidez es más marcada y persistente en los caldos glucosados y glicerinados.

Suero coagulado. — Constituye el medio de elección para el diagnóstico y un procedimiento de identificación y aislamiento porque su desarrollo en este medio es más rápido que el de cualquier otro germen con el que pueda confundírsele o estar asociado.

Ya a las 18 horas aparecen colonias en forma de puntos blancos grisáceos que toman rápidamente el volumen de una cabeza de alfiler. En los cultivos viejos las colonias alcanzan hasta 2 mm. de diámetro.

En estría se presenta en forma de una banda grisácea.

Agar. — Igual que en suero coagulado pero el desarrollo es más lento.

Agar Veillon (medio anaerobio). — Se desarrolla en profundidad y en superficie: (diferencia con los pseudo-diftéricos).

Gelatina. — Desarrollo escaso sin liquefacción.

Leche. — Desarrollo abundante sin coagulación.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Acción sobre los azúcares. — Fermenta sin producción de gas la levulosa, la galactosa, la maltosa, la glicerina y la glucosa (diferencia con los pseudo-diftéricos). Esta acción es muy variable de una cepa a otra. No fermenta la sacarosa, la lactosa, la manita, la dulcita y la rafinosa.

Acción reductora. — No tiene.

Acción hemolítica. — Muy débil. No parece estar en relación ni con la toxicidad ni la virulencia de las razas.

Vitalidad. — Se conserva vivo en los cultivos durante 5 ó 6 meses. Al estado húmedo pierde en pocos minutos su vitalidad a 58 grados y por acción de los antisépticos. Al estado seco en las falsas membranas o cultivos desecados, resiste varios minutos a 95 grados y a los antisépticos.

TOXINA

Pertenece al tipo de las toxinas solubles o exotoxinas. En el hombre y en los animales inoculados experimentalmente, es el factor determinante de los trastornos provocados por la presencia del bacilo diftérico en estos organismos.

En los medios de cultivo y especialmente en los medios líquidos, se difunde sin que haya necesidad de destruir los cuerpos bacterianos (toxina soluble, exotoxina) para librarla. Ella se produce a medida que se desarrolla el germen.

Sin embargo, se ha descrito una endotoxina, (Rist), existente en los cuerpos bacterianos, diferente de la toxina soluble no neutralizable por el suero.

La toxina soluble se prepara cultivando una cepa toxígena en caldo apropiado, caldo Martín, dispuesto en gran superficie y a condición de que la reacción del medio se mantenga lo más fija posible evitando la acidificación. A los ocho días, que es cuando la actividad de la toxina llega a su máximo se la obtiene por filtración.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL. — Inoculada a los animales sensibles a la infección diftérica, la toxina reproduce los mismos efectos que los cultivos vivos. Con dosis de 1/10 y 1/100 de c.c., produce el edema en el punto de inoculación y la muerte entre 24 y 48 horas. Con dosis menores, no mortales, el animal enflaquece progresivamente y con frecuencia, especialmente en el conejo, hay necrosis de las fibras cardíacas (miocarditis) y parálisis.

sis de las extremidades posteriores. La toxina, al igual que los cultivos, aplicada en la superficie de las mucosas, forma falsas membranas.

TITULACIÓN DE LA TOXINA. — La actividad de la toxina es muy variable a pesar de que se utilice siempre el mismo método y las mismas condiciones para su obtención. Por lo tanto, una vez preparada, toda toxina debe titularse.

a) *Por inoculación:*

Se prepara diluciones crecientes de la toxina a titular en agua estéril, 1/100, 1/200, 1/500, etc. Se toman tantos cuyes como diluciones se hayan hecho y se inyecta cada animal con 1 c.c. de cada dilución. La cantidad menor de toxina que provoca la muerte del cuy de 250 gramos de peso en 96 horas, se denomina **dosis mortal mínima (D. M. M.)**, o **unidad tóxica**. Si por ejemplo el cuy inoculado con 1 c.c. de la dilución al 1/600 muere en estas condiciones, se dice que la toxina contiene 600 unidades por centímetro cúbico.

b) *Por floculación:*

La toxina posee la propiedad de precipitar o flocular en contacto del suero antitóxico correspondiente. La acción floculante se manifiesta desde el momento que la toxina es neutralizada exactamente por la antitoxina. Luego, se podrá medir el poder de floculación de las toxinas por la cantidad de antitoxina que provoca la aparición de la floculación inicial.

Sin embargo, el poder floculante de una toxina no siempre marcha paralelamente con el poder tóxico. Este aumenta a la par que el poder floculante durante el período de elaboración de la toxina, (alrededor de 8 días). Pero en las toxinas antiguas, en tanto que el poder tóxico baja gradualmente, el poder floculante se mantiene estacionario.

La técnica consiste en colocar en una serie de tubos un volumen constante de la toxina a titular: sea 2 c.c., agregando en seguida cantidades decrecientes (2; 1,6; 1,4; 1,0; 0,9; 0,8 c.c., etc.), de un suero antitóxico con el cual se ha hecho previamente una

tabla que indica el número de dosis mortales de toxina correspondientes a cada dosis del suero test. Después de agitar, se deja en reposo a la temperatura de 54 grados y se vigila la aparición de la primera floculación. Si ésta se produce en el tubo que contiene 0,9 c.c. de suero, por ejemplo, se busca en la tabla el número correspondiente a 0,9 c.c., sea 765 dosis mortales por centímetro cúbico.

De lo dicho se desprende que la titulación por floculación sólo mide exactamente el poder tóxico en el período de elaboración de la toxina y posteriormente sólo el valor máximo alcanzado durante su preparación.

ANATOXINA

Es la toxina diftérica que ha perdido su poder tóxico, conservando su poder antigénico (toxina atóxica) por la acción de ciertas sustancias químicas.

Ramon prepara su anatoxina tratando la toxina por el formol comercial a la dosis de 3 a 4 por mil y conservando la mezcla en la estufa a 40 - 42 grados durante un mes.

La anatoxina desprovista de toxicidad, (inocuidad absoluta) conserva todas las propiedades antigénicas y floculantes de la toxina de origen, en cantidades sensiblemente equivalentes. A mayor poder floculante, mayor poder inmunizante o antigénico. Basado en este paralelismo se ha avaluado el valor antigénico de la anatoxina en unidades anatóxicas representadas por el número de unidades antitóxicas capaces de saturar "in vitro" 1 c.c. de anatoxina, o sea, hacer aparecer la floculación inicial.

SUERO ANTITÓXICO

En la práctica se obtiene del caballo por inmunización con toxina o anatoxina a dosis progresivas. El suero del animal así tratado se denomina **suero antidiftérico** o **antitóxico diftérico** y tiene propiedades preventivas y terapéuticas en el hombre y en los animales sometidos a la acción del veneno diftérico y del microbio vivo.

La inmunidad que determina es pasajera, carece de propieda-

des bactericidas y posee rara vez las propiedades aglutinantes, pero tiene alto poder neutralizante.

TITULACIÓN. — *Técnica de Ehrlich.* — Se basa en la propiedad que tiene la antitoxina de neutralizar la toxina "in vitro".

Para el suero antitoxico Ehrlich introdujo una unidad de medida, la **unidad antitoxica (U. A.)**, que representa la dosis de suero que es capaz de neutralizar cien dosis mortales mínimas de toxina (D. M. M.).

En primer término hay que procurarse una buena toxina titulada. En seguida es preciso determinar, por inoculación en el cuy, la dosis de esta toxina que es exactamente neutralizada por la unidad antitoxica de los sueros etalones que suministran ciertos Institutos científicos. Esta dosis de toxina se designa Lo. Después se determina la dosis suplementaria de toxina que hay que añadir a Lo, que se ha hecho inofensiva por neutralización, para transformarla en una dosis L + que mata, seguramente, al cuy en las condiciones ya indicadas. Podría creerse que esta dosis debería ser la D. M. M.

= Lo + 1, puesto que Lo ha sido neutralizada exactamente; pero en la práctica es siempre un poco superior a la D. M. M. Conocida la dosis L. + de la toxina, se puede titular fácilmente cualquier suero.

Se preparan volúmenes de suero al 1/100; 1/150; 1/200, etcétera, y se mezcla 1 c.c. de cada disolución a la dosis L + de toxina. Se completa el volumen de 3 c.c. por adición de suero fisiológico y después de 30 minutos de contacto a la temperatura de 5 grados se inocula bajo la piel de cuyes de 200 a 300 gramos de peso. Se dice que un suero contiene al 1/200 mezclado a la dosis L + de toxina, no mata al cuy en 4 días.

DIFTERIA EXPERIMENTAL

El cuy es animal de elección.

Inoculación subcutánea. — La inoculación subcutánea de 0,5 a 1 c.c. de un cultivo de 24 horas en el caldo determina la muerte del animal en 2 ó 3 días según el poder patógeno del germen. Se produce edema en el sitio de inoculación, alza térmica, respiración

anhelante, el pelo se eriza y el animal sucumbe. Cuando los cultivos son poco toxígenos, el cuy puede escapar a la muerte; al edema local sigue la formación de una escara que se elimina y el animal cura. El mismo cuadro se observa con la inoculación de la toxina.

En el edema subcutáneo el bacilo pulula hasta la octava hora: su multiplicación se detiene y su número decrece progresivamente. *No pasa jamás a la sangre ni a las vísceras.*

A la autopsia se nota una congestión intensa de las vísceras, particularmente de las cápsulas suprarrenales que se presentan tumefactas hiperémicas y de color rojo oscuro. A veces se encuentra exudado abundante en las serosas.

Inoculación a nivel de las mucosas. — La inoculación intratraqueal, previa escoriación de la mucosa, produce falsas membranas, un verdadero crup y la muerte sobreviene rápidamente. Se puede reproducir falsas membranas en todas las mucosas previamente escoriadas. La presencia de gérmenes en una mucosa sana no basta para producir lesiones.

Se puede reproducir falsas membranas sobre la conjuntiva y vulva de cuyes, infectando la mucosa escoriada con cultivos frescos.

Inoculación intraperitoneal. — Esta inoculación es menos severa que la subcutánea y no provoca la muerte sino en 4 a 10 días con derrame peritoneal y lesiones viscerales típicas. El bacilo no se generaliza.

Conejo.

Es menos sensible y no sucumbe sino a la inoculación de cultivos muy toxígenos, a los 5 ó 7 días, con edema en el punto de inoculación, aumento de volumen y congestión de las suprarrenales y a veces parálisis de las extremidades posteriores.

La inoculación en la piel escoriada de la parte interna de la oreja produce falsas membranas. La inoculación intratraqueal y en las mucosas ocular y vulvar produce las mismas lesiones que en el cuy.

El perro, el gato, la vaca, son sensibles a la inoculación experimental del bacilo diftérico. Esta última puede presentar también la difteria espontánea (mamitis diftérica).

La *rata* y la *laucha* son refractarias.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

La infección por el bacilo de Loeffler puede prestarse a dos clases de investigaciones: la de la inmunidad conferida por medio de la reacción de Shick y la del germen propiamente dicho.

1) Investigación del germen:

La investigación del germen está indicada como un elemento de diagnóstico indispensable en muchos casos y como elemento de profilaxis en los convalecientes o en los individuos sanos, cuando se quiere saber si son portadores de gérmenes.

TOMA DE LA MUESTRA:

Técnica. — Material: Un mechero o lámpara de alcohol, una tórula montada en alambre y esterilizada, o bien un asa de platino. Un baja-lengua. Porta-objetos. Dos o tres tubos de suero coagulado.

Colocar la fuente de luz y emplear el baja-lengua lo mismo que para practicar un examen de la faringe. Tocar con la tórula suavemente en la zona sospechosa (falsa membrana), sin traumatizar ni hacer sangrar la mucosa. Al retirar la tórula evitar de tocar ningún otro punto de la cavidad bucal. Sembrar sucesivamente, sin volver a cargar, sobre dos o tres tubos de suero coagulado y con el resto hacer dos o tres frotis. Llevar los cultivos a la estufa a 37 grados.

Examen directo del frotis.

Teñir por el método de Gram una o dos preparaciones, cuidando que la decoloración con alcohol acetona sea breve, y en otra, prolongando este tiempo. El bacilo de Loeffler presentará los caracteres ya estudiados: Bacilo Gram positivo, poco resistente a la decoloración, tamaño mediano o largo, a veces formas de involución, agrupación en empalizadas. Los bacilos difteromorfos (B. de Hoffmann, especialmente), se presentan: como bacilos cortos, Gram positivos, resistentes a la decoloración, agrupación en empalizadas.

En los cultivos.

Se vigilará la aparición de las primeras colonias examinando al microscopio las sospechosas.

Si el examen anterior da resultado dudoso, se procede a la prueba de la anaerobiosis sembrando en agar Veillon y también a la prueba de los azúcares y al estudio del poder patógeno.

Presentan hoy gran interés los medios de cultivos "al telurito", por considerarse los más electivos. Entre éstos el más recomendable es el **medio de Pér gola**, constituido de suero, huevo y telurito de potasio debidamente solidificado.

PREPARACION DEL MEDIO DE PERGOLA:

Suero de buey o caballo	100 c.c.
Yemas de huevo	1
Solución de telurito potásico al 1%	2 c.c.

Mezclar en un matraz agitando suavemente hasta la completa emulsión de la yema de huevo e introducir en el gelatinizador de Koch para calentar a 85 y 90 grados durante veinte minutos, 3 días consecutivos. El medio debe quedar color amarillo huevo. Para la siembra se procede igual que con el suero coagulado.

En este medio las colonias del bacilo diftérico adquieren a las 12-15 horas un color claro y son solevantadas y húmedas. Las colonias no diftéricas son negras.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

Examen del frotis:

- 1) Gran número de bacilos largos y medianos con los caracteres del Loeffler confirman el diagnóstico.
- 2) El resultado negativo no faculta para negar la difteria.
- 3) En ambos casos debe recurrirse al cultivo.
- 4) Asociaciones microbianas. Para afirmar el diagnóstico de asociación microbiana es preciso que el germen asociado predomine apreciablemente sobre el resto de la flora microbiana tanto en el frotis como en los cultivos.

Examen de los cultivos:

1) Si las colonias son más o menos numerosas y están formadas de bacilos largos o medianos con los demás caracteres del Loeffler, se confirma la difteria.

2) Si las colonias corresponden a bacilos cortos, hay que proceder a la diferenciación por las pruebas de la anaerobiosis, de la fermentación de los azúcares y de la inoculación experimental.

2) Investigación de la inmunidad diftérica por la reacción de Schick.

El estado refractario frente a la infección diftérica se debe a los siguientes hechos:

1.—En el suero normal de ciertos individuos existe una antitoxina natural.

a) En el lactante hasta los 6 meses, de carácter pasivo por transmisión de anticuerpos de la madre al feto durante la vida intrauterina y, posteriormente, por la leche durante la lactancia.

b) Activa, en la mayoría de los adultos, a consecuencia del ataque anterior de una difteria manifiesta u oculta.

c) La inmunidad más o menos acentuada de estos individuos depende de la cantidad mayor o menor de antitoxina contenida en su suero.

PRINCIPIO DE LA REACCIÓN DE SCHICK.—Si se introduce en el dermis una pequeña cantidad de toxina diftérica diluída, el individuo inmune no experimentará la menor reacción local, porque lleva en su plasma cierta cantidad de antitoxina capaz de neutralizar la pequeña dosis de toxina inyectada: (*reacción negativa*). Si es receptivo su suero carece de antitoxina y la toxina actúa produciendo una reacción específica: (*reacción positiva*).

En resumen, la *Reacción de Schick* es una prueba de inmunidad, y no de hipersensibilidad, frente a la toxina diftérica.

TECNICA:

Inocular en el dermis de la cara anterior del antebrazo una cantidad de toxina equivalente a 1/50 de la D. M. M. contenida en el volumen de 1/10 c.c.

En la región vecina o en el antebrazo opuesto practicar el control con la misma dilución y el mismo volumen de toxina calentada a 75 grados durante 5 minutos (inactivada).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

La **reacción positiva** se caracteriza por:

a) Aparición lenta, es decir, 24 a 48 horas después de la inyección.

b) Presencia de una mácula roja que generalmente progresa y se transforma en una placa papulosa; rara vez se produce edema.

c) La reacción alcanza su máximo a los 3 ó 4 días.

d) Desaparición gradual con descamación y pigmentación al 8º ó 10º día.

Las **pseudo reacciones** o **reacciones paradójales**, son fenómenos de hipersensibilidad del organismo frente a sustancias contenidas en el caldo que ha servido para preparar la toxina. Se caracterizan por:

a) Aparición precoz a la 6ª u 8ª hora.

b) Llegan a su máximo a las 20 ó 48 horas.

c) Desaparecen, sin dejar huella, al 3º ó 4º día.

d) Son más infiltradas y menos circunscritas que la verdadera reacción de Schick.

e) No producen descamación ni pigmentación.

Los siguientes casos pueden presentarse:

1º Si no hay reacción con la toxina calentada y se produce con la toxina no calentada: *reacción positiva*.

2º Si las dos intradermo - reacciones son positivas con los caracteres de las pseudo - reacciones, podemos afirmar que se trata de una *Reacción de Schick negativa*.

3º Si se produce con la toxina calentada una reacción rápida que desaparece al tercer día, y en el brazo inoculado con la toxina no calentada se determina una reacción que progresa y llega a su máximo al tercer día, se puede concluir de que se trata de una *reacción positiva*.

4º Si ambas zonas inoculadas no presentan manifestación alguna, se puede afirmar que la *Reacción de Schick* es *absolutamente negativa*.

BACILOS DIFTEROMORFOS

En general son muy semejantes morfológicamente al *B. diftérico* junto con el cual, como hemos visto, forman el grupo de los *Corynebacterium*.

Corynebacterium communis o ***B. pseudo-diftérico de Hoffman***.

Vive como saprófito en la mucosa de la faringe y fosas nasales.

Corynebacterium cutis. — Vive en la piel y en las mucosas y como germen de asociación en algunos procesos supurados.

Corynebacterium xerosis. — Se encuentra como germen de asociación en las afecciones de la córnea y de la conjuntiva.

Se desarrollan mejor y más rápidamente en los medios ordinarios. Por lo general enturbian completamente el caldo y no forman velo.

En agar profundo regenerado no crecen en la profundidad sino en la zona de aerobiosis y en la superficie, (método diferencial) a excepción del *C. cutis*.

No tienen propiedades hemolíticas.

Carecen de poder patógeno.

El *C. communis* no fermenta ningún azúcar y resiste energicamente la decoloración por el método de Gram.

El *C. cutis* fermenta los mismos azúcares que el *B. diftérico*, se desarrolla en anaerobiosis y como él resiste poco a la decoloración por el método de Gram. Es considerado por algunos autores como en *B. de Loeffler*, que ha perdido su poder patógeno.

El *C. xerosis* tiene los caracteres del anterior y da cultivos muy finos.

CAPITULO XXIV

TETANOS

BACILO DE NICOLAÏER

GENERALIDADES

Este anaerobio se encuentra en la tierra, en los vegetales, en el intestino del hombre y de los herbívoros ("portadores de gérmenes"). cuyos excrementos desempeñan un papel importante en la diseminación de las esporas tetánicas en el medio ambiente. En el organismo enfermo es posible encontrarlo en el pus de la herida. No invade ni la sangre ni las vísceras.

MORFOLOGÍA

Es un bacilo recto, delgado, de 3 a 4 micrones de largo por 0,3 de ancho, con cilios peritricos que le dan, en los cultivos recientes, movilidad a los gérmenes no esporulados. Toman la coloración de Gram (Gram +). La única espora que poseen se sitúa terminalmente dándole al bacilo el aspecto de alfiler o palillo de tambor.

CULTIVOS

Anaerobio poco exigente; puede crecer en medios que posean cierta cantidad de oxígeno. Se desarrolla entre 14 y 43 grados. Temperatura óptima: 38 grados.

Caldo glucosado. — Enturbiamiento. Sedimenta a los 13 ó 14 días. Olor desagradable (cuerno quemado).

Caldo-carne. — Los mismos caracteres. No digiere la carne.

Caldo-sangre. — Hemólisis (tetanolisina).

Agar profundo. (Medio de Veillon). — Colonias radiadas y con núcleo central o en copos de algodón. Gases.

Gelatina. — Colonias radiadas como en agar. Licuefacción lenta (dos semanas). Colonias rodeadas de burbujas de gas.

Leche. — Buen desarrollo. No coagula.

Suero coagulado. — Digestión lenta o nula.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades proteolíticas. — Poco enérgicas. Licúa lentamente la gelatina. No altera la ovo-albúmina, ni la carne. Digestión lenta o nula del suero coagulado.

Propiedades sacarolíticas. — Fermenta excepcionalmente la glucosa.

Hemolisina. — Genera una hemolisina activa para los glóbulos rojos de la mayor parte de los animales (**tetanolisina**).

Aglutinabilidad. — El B. de Nicolaier no es aglutinado por el suero de los hombres o animales atacados de tétanos. Los sueros antimicrobianos han revelado la existencia de varios tipos serológicos. El suero de los individuos portadores de gérmenes posee, con el tiempo, aglutininas para las cepas homólogas. La toxina elaborada por las distintas razas aglutinantes es idéntica y neutralizada, por consiguiente, por cualquier antitoxina tetánica.

Vitalidad y virulencia.—El bacilo del tétanos expuesto a la acción de la luz y el aire o de los antisépticos o del calor, muere rápidamente.

Las esporas del tétanos son muy resistentes a los agentes exteriores. Mueren en 6 horas al calor húmedo a 80° C y en dos a tres horas a 90° en las mismas condiciones. A la temperatura de ebullición se destruyen en 5 a 8 minutos. Las esporas mezcladas con tierra y a la obscuridad conservan su vitalidad y virulencia durante años; pero desecadas en hilos de seda o papel y expuestas a la luz y al aire se alteran rápidamente. Desecadas con el pus, líquidos albuminosos, sustancias porosas, trozos de astillas o proyectiles, las esporas conservan su vitalidad y virulencia por mucho tiempo.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

En general los animales son sensibles a la infección tetánica. Se utilizan de preferencia *la laucha, la rata y el cuy*. El conejo y especialmente el perro, son más resistentes.

Es posible provocar el tétanos inoculando *el pus, la tierra tetanígena, los cultivos puros o la toxina*. Los síntomas son siempre semejantes: tumefacción en el punto de inoculación, contracturas, después de un período mayor o menor, pero fatal, de incubación. Estas contracturas aparecen primero a nivel de la región inyectada para generalizarse después. El animal sucumbe a las 36 ó 48 horas de iniciarse los síntomas. Todas las vías, a excepción de la digestiva, provocan el tétanos típico.

El microbio no se generaliza. La inoculación de dosis mínimas produce el "tétanos local", y el animal muere a los 20 ó 30 días o puede curar.

Las esporas puras, lavadas y calentadas a 80 grados son inofensivas. Si se inoculan en ciertas condiciones (traumatismos, asociaciones microbianas, ácidos, toxinas, etc.), esas esporas germinan y el tétanos estalla.

TOXINA

Es un microbio esencialmente toxígeno. La toxina es muy activa y tiene afinidad especial por el sistema nervioso. Se obtiene cultivando el germen en caldo - carne con extracto de órganos a pH 7,6 a 8 y a 37 grados. La inoculación de 1/40.000 de c.c., en el cuy, por cualquiera vía, produce el tétanos idéntico a la infección: (local o general).

El cuy nuevo es sensible a la ingestión de toxina. La laucha, animal indiferente a la ingestión de toxina, sucumbe, sin embargo, a la intoxicación por esa vía si se hace previamente ingerir bilis (método de Besredka). El conejo es refractario a la intoxicación por vía digestiva.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

Indicaciones. — En la práctica es poco frecuente la necesidad de investigar el agente microbiano del tétanos. El diagnóstico clínico de la enfermedad es, en general, fácil.

La investigación bacteriológica puede hacerse:

1° En la *tierra, polvo, etc.*, con el objeto de saber si son productos contaminados.

2° En una *herida más o menos anfractuosa*, sucia con tierra y cuerpos extraños diversos (trozos de vestido, balas, vidrios, etc.).

3º En las *heridas operatorias* y en el *instrumental quirúrgico* o *catgut* cuando hay sospecha de contaminación.

El germen debe investigarse por el examen del pus, por cultivos y por inoculación experimental que autoriza un diagnóstico seguro, pues por su morfología y caracteres de cultivo puede confundírsele con el *Bacillus putrificus* o el *Bacillus tetanoides*.

Examen directo. — Hacer frotis con el pus o el exudado de la herida. Colorear por el método de Gram. Entre los gérmenes de asociación, generalmente abundantes, se observan los *B. tetánicos* excepcionalmente esporulados y en cantidad mínima, lo que dificulta el diagnóstico bacteriológico. Si el examen es negativo no debe excluirse por ello la posibilidad de infección. El examen directo es insuficiente.

Examen por cultivos. — Sembrar el producto patológico en caldo peptonado fresco y en anaerobiosis. Al cabo de 5 días, para purificar el cultivo, calentarlo algunos minutos a 100 grados, los gérmenes son muertos, las esporas tetánicas resisten. A veces se halla mezclado al *Vibrión séptico* o al *B. putrificus* (a esporas terminales). Como ambos gérmenes también resisten el calentamiento gracias a sus esporas, es necesario obtener cultivos por agotamiento en medios sólidos para aislarlos (varios tubos de Agar de Veillon).

Examen por inoculación. — La reproducción del tétanos en los animales de laboratorio (laucha o cuy) por inoculación de productos patológicos o de los cultivos, confirma plenamente el diagnóstico bacteriológico.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.—Para afirmar la presencia del *B. tetánico* será preciso no contentarse con los solos "caracteres morfológicos", que son comunes a otros gérmenes (*B. putrificus* de Bienstock) igualmente presentes en el polvo y en la tierra. Precisaré confirmar el diagnóstico mediante los cultivos y especialmente la inoculación experimental.

CAPITULO XXV

BOTULISMO

BACILO BOTULÍNICO (*BACILLUS BOTULINUS*)

GENERALIDADES

El *B. Botulínico* de Van Ermengem es el agente del botulismo, afección provocada exclusivamente por la ingestión de conservas alimenticias alteradas a consecuencia de su desarrollo en ellas.

Este anaerobio se halla relativamente difundido en las tierras y a veces se lo encuentra en las materias fecales.

No solamente las conservas alimenticias a base de carne, productos de caza, pescado, etc., sino también las conservas vegetales (porotos, espinacas, espárragos, aceitunas, frutas, etc.), pueden alterarse por el *B. botulínico* que elabora una activísima exotoxina resistente a los jugos digestivos y, por consiguiente, patógena por vía oral. Las conservas contaminadas con *B. botulínico* no exhalan olor pútrido, sino a veces un ligero olor butírico.

Los síntomas predominantes de la intoxicación botulínica son esencialmente nerviosos y secretores (de tipo paralítico).

Se ha establecido la existencia de cuatro tipos de *B. botulínicos*: "A", "B", "C" y "D", siendo los dos primeros los más frecuentemente encontrados en las intoxicaciones humanas. Estos tipos son exactamente iguales respecto a morfología, caracteres culturales y acción patógena de la toxina; sólo difieren por el comportamiento serológico de las toxinas frente a sus antitoxinas respectivas.

MORFOLOGÍA

Bacilos rectos, de extremos redondeados de 4 a 8 micrones de largo por 0,9 a 1 micrón de grosor; cilios peritricos, poco móviles. Esporas terminales o subterminales. No se forman en los cultivos a temperaturas superiores a 35°. Las esporas son destruidas por calentamiento a 115° durante 10 minutos y resisten varias horas a 100°.

Coloración. — Gram positivo.

CULTIVOS

Anaerobio estricto. Prefiere los medios ricos en peptona adicionados de extractos de órganos y fuertemente azucarados y también los caldos vegetales (trigo, maíz, papas, etc.). Optimum térmico: entre 20 y 30 grados. Se desarrolla difícilmente a 37 grados y sin formación de toxina.

Medios líquidos (Caldo glucosado, Caldo-carne, Caldo-huevo).

Enturbiamiento; mucho gas (olor butírico, no pútrido). Hemólisis en los medios adicionados de sangre.

Agar - profundo. — Colonias en forma de discos delgados traslúcidos, con núcleo excéntrico, opaco, rodeadas de burbujas de gas.

Gelatina. — Colonias como en agar. Licuefacción del medio.

Leche. — No coagula.

Suero coagulado. — Digestión rápida del medio.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades proteolíticas. — Enérgica. Licuefacción de la gelatina. Digestión del suero coagulado, de la carne y de la ovoalbúmina.

Propiedades sacarolíticas. — Fermenta con producción de gas la glucosa, la levulosa, la maltosa y la glicerina.

ACCIÓN PATÓGENA

Como el B. botulínico no se multiplica a temperaturas superiores a 37°, su inoculación es inocua a los animales de laboratorio y la enfermedad humana es producida por la toxina preformada en las conservas, ya que es imposible la infección bacilar.

TOXINA

Se produce en los medios con carne y extractos de órganos. en los medios con jugos de legumbres (trigo, arvejas) y también en

las conservas de frutas y legumbres (arvejas, papas, maíz, frejoles). Se genera entre 22° y 37°; temperatura óptima: 35°. Es la exotoxina más activa que se conoce: mata en cuatro días a un cuy de 250 gramos de peso a la dosis de 1/500.000 ó 1/1.000.000 de c.c. en inyección subcutánea. Por vía oral se necesita una dosis mil veces mayor. La toxina es destruida por calentamiento a 100° durante 90 minutos. La resistencia al calor varía de una raza a otra. Para destruir con seguridad la toxina botulínica en las conservas alimenticias es necesario prolongar la ebullición durante 20 a 40 minutos.

Animales sensibles a la toxina botulínica. — Todos los animales pueden adquirir la enfermedad por la ingestión de conservas averiadas o forrajes infectados. Se manifiesta la enfermedad por parálisis de los músculos del cuello y de los ojos. A la autopsia, no se encuentran lesiones macroscópicas de los órganos.

DIAGNÓSTICO DE LA INTOXICACIÓN BOTULÍNICA

En las conservas. — Por siembras y aislamiento en el medio de Veillon se hará la investigación del bacilo. La presencia de toxina botulínica se revelará haciendo ingerir la conserva a un animal sensible (pollo, laucha), o bien inyectando la parte líquida del alimento.

En el hombre. — No es práctico ni alcanza a hacerse dentro del plazo útil. Excepcionalmente ha sido posible encontrar en la sangre suficiente toxina para matar a la laucha o al cuy.

Diagnóstico de "tipo". — Inocular a 3 lauchas blancas:

Nº 1 Con mezcla de toxina o producto sospechoso + Suero anti A.

Nº 2 Con mezcla de toxina o producto sospechoso + Suero anti B.

Nº 3 Con mezcla de toxina o producto sospechoso + Suero normal.

La toxina será del tipo correspondiente al animal que sobrevive.

SUEROTERAPIA

Los sueros antibotulínicos se preparan inoculando caballos con anatoxina botulínica. El suero curativo es de tipo específico y en la práctica se emplean sueros polivalentes.

Los narcóticos (morfina, luminal) y los anestésicos (éter), ayudan eficazmente al tratamiento retardando el avance de la intoxicación.

CAPITULO XXVI

MICROBIOLOGIA NORMAL DEL INTESTINO

FERMENTACIONES Y PUTREFACCIONES

El tubo digestivo del recién nacido es aséptico, pero ya al cabo de algunas horas comienza a poblarse de gérmenes diversos, muchos de los cuales son destruidos o eliminados. Las especies microbianas que se adaptan al medio intestinal constituyen posteriormente lo que se denomina **flora normal** u **obligada**.

Pero antes de constituirse esta flora normal, el microbismo intestinal pasa por distintas fases:

1º *Fase aséptica*. — Corresponde a las 20 ó 30 primeras horas que siguen al nacimiento durante las cuales el intestino es absolutamente estéril.

2º *Fase de infección creciente*. — La aparición de los microbios en el tubo digestivo se produce aún antes de todo ensayo de alimentación; comienza con la eliminación del meconio y se completa con las primeras deposiciones de leche. Esta flora es muy variada (medio exterior, estación del año, etc.), y está constituida principalmente por Estafilococos blancos, Colibacilos, *B. Perfringens*, *B. lactis aerogenes*, Enterococo, Sarcinas, *B. mesentericus*, *B. acidófilo*, etc.

3º *Fase de simplificación*. — A partir del tercer o cuarto día esta flora tan variada se simplifica bruscamente bajo la influencia de la alimentación invariable del lactante. El examen microscópico

de las deposiciones pone en evidencia una sola especie microbiana: el **Bacilo bífido de Tissier**. Este germen es un diplo - bacilo Gram positivo, anaerobio estricto, gran fermentador de los azúcares. (Fermento láctico).

En los niños con alimentación artificial (biberón, etc.), la fase de infección creciente se prolonga mucho y no se simplifica bruscamente ni totalmente como en los alimentados a pecho. El examen microscópico de las deposiciones nos revela, en efecto, que al lado del *B. bífido* se encuentran otras especies microbianas, (*Coli*, *Acidófilo*, *Lactis aerogenes*, *Bacilo III de Rodella*, *Estafilococo blanco*, *sarcinas*, etc.).

La fase de "simplificación" termina con el destete. Bajo la influencia de la alimentación mixta la flora intestinal se complica con la aparición de gran cantidad de especies microbianas que dan a las deposiciones el aspecto microscópico característico de la flora intestinal obligada o normal.

FLORA MICROBIANA NORMAL

Normalmente los microbios sacarolíticos o amilolíticos predominan sobre los gérmenes proteolíticos. La flora sacarolítica, (*Coli*, Enterococo, *Lactis aerogenes*, *B. acidí lactici*, etc.), por su constante producción de ácidos, impide el desarrollo de los microbios de la putrefacción (*Proteus*, *Mesentericus*, *Subtilis*, Anaerobios diversos, etc.). La coloración de las deposiciones por el método de Gram, que colorea en rojo los sacarolíticos y en azul los proteolíticos, permite en forma práctica diferenciar ambas floras. La **flora roja** o **de fermentación**, predomina en las deposiciones normales y en especial en la alimentación hidro - carbonada. En cambio la **flora azul** o **de putrefacción**, desplaza a la roja en la alimentación cárnea y en ciertos trastornos intestinales (constipación rebelde, diarreas de putrefacción, etc.).

FERMENTOS LACTICOS

El concepto de fermento láctico ha debido evolucionar con los progresos de la bacteriología, especialmente en aquel aspecto que dice relación con los procesos de fermentación. Se debe a Pasteur el haber claramente demostrado que dichos procesos son vitales en el sentido de que ellos presuponen la existencia en el ele-

mento a fermentar de un ser vivo, organizado, de cuya vida depende todo el mecanismo de la fermentación.

De acuerdo con lo anterior, los fermentos lácticos son microorganismos que transforman las materias azucaradas en ácido láctico. Sin embargo, numerosas son las especies microbianas que producen ácido láctico como un elemento de su metabolismo frente a los hidratos de carbono. Es el caso del estafilococo, del estreptococo, del neumococo, etc., a los cuales no se les puede considerar como fermentos lácticos en sentido estricto. En efecto, la escuela moderna ha aplicado para ellos el mismo criterio que para los fermentos acéticos. Es un criterio, por así decirlo, cuantitativo, dado que considera como tales a aquellos gérmenes en los cuales la producción de ácido láctico se cifra por una tasa elevada, utilizable en la práctica y, por lo tanto, en terapéutica.

Por definición, los fermentos lácticos son microorganismos que determinan una fermentación láctica propiamente dicha, caracterizada por una gran producción de ácidos, especialmente ácido láctico, a expensas de la casi totalidad (90 a 95%) del hidrato de carbono presente. Se comprende lo difícil que es fijar el límite de la transformación del azúcar de una manera precisa, ya que se trata de un fenómeno biológico. Se pueden aceptar rendimientos inferiores, aun de un 50%, a condición de que sean importantes, es decir, utilizables.

Fijado así el concepto de fermento láctico, ha empezado a considerarse el problema con criterio científico, intentando relacionar en una clasificación amplia las múltiples especies que han sido aisladas de la naturaleza y que empíricamente se utilizaban en la alimentación, en la industria y aun en medicina práctica. En efecto, las leches ácidas que forman parte de la alimentación corriente de numerosos pueblos orientales, deben su acción antipútrida a la presencia de especies del tipo de los fermentos lácticos, cuyas propiedades varían según la región de donde proceden. Es, a partir del yoghourt, del kefir, del koumiss, del leben etc., para no citar sino las más conocidas, de donde se han aislado las diferentes especies de microorganismos que presentan en más alto grado la propiedad de fermentar los hidratos de carbono.

Este conjunto de especies, que podemos denominar "flora láctica verdadera", está constituido, en líneas generales, por dos tipos morfológicos: coccus, Gram positivos, que se agrupan en diplococos o en cadenas y bacilos que toman el Gram a los cuales Beijerinck propuso dar el nombre general de lactobacilos.

El iniciador de la sistemática del grupo, ha sido Orla - Jensen, quien ha propuesto una clasificación que contempla a la vez los caracteres morfológicos, de cultivo y las propiedades enzimáticas frente a los diferentes componentes de la leche.

De las múltiples especies que dicha clasificación engloba, nosotros hemos de considerar en detalle aquellas que tienen aplicación en Medicina, a las cuales nos vamos a referir a continuación. Dichas especies son: el bacilo búlgaro de Grigoroff, el bacilo acidófilo de Moro y los estreptococos lácticos.

BACILO BULGARO DE GRIGOROFF.

Es un germen que se encuentra especialmente en el yoghourt, leche ácida

de Bulgaria, que se obtiene sembrando la leche con un producto conocido con el nombre de "maya", obtenido por desecación de un yogourth antiguo.

Se encuentran en el yoghourt varias especies de bacterias, de las cuales la más importante es el bacilo búlgaro, fermento láctico muy enérgico.

Morfología. — Los elementos que lo representan son bastones de grosor variable, de 6 a 7 micrones de longitud, por 0,5 micrones, inmóviles, de extremidades algo redondeadas, a menudo en cadenas, a veces en filamentos.

Se colorean bien con los colores básicos de la anilina. Son Gram positivos.

Caracteres de los cultivos. — El bacilo búlgaro se desarrolla mejor en presencia de aire, pero parece ser anaerobio facultativo.

No vegeta a la temperatura ordinaria ni en general por debajo de 22°. Se desarrolla poco a 37°, tiene su óptimum térmico a 40°, creciendo aún bien a 45° y hasta a 50°. Se le ha considerado, por lo tanto, como una especie termófila.

En agar, gelatina y caldo ordinario se desarrolla poco o no se desarrolla. Al contrario en agar - glucosado, lactosado o en agar - suero de leche se desarrolla abundantemente, dando colonias pequeñas, puntiformes, de color blanco amarillento.

No se desarrolla en papa.

La leche es un espléndido medio de cultivo: a 40° se coagula en algunas horas, prolongándose el tiempo de coagulación a medida que la temperatura desciende.

La cantidad de ácido láctico producido alcanza a 25 y aun 30 grs. por litro de leche, en tanto que los otros buenos fermentos lácticos dan apenas 10 grs. Es una mezcla de ácidos lácticos derecho e izquierdo.

Además de la lactosa, fermenta la glucosa, la maltosa, la manita, determinando la formación de ácidos láctico, acético, fórmico, oxálico y alcohol, sin producción de gas.

Bacteriológicamente considerado el bacilo búlgaro se revela como el más poderoso de los fermentos lácticos cuyas grandes aplicaciones en la industria y en terapéutica las consideraremos en conjunto con la de los otros tipos que vamos a describir a continuación.

BACILO ACIDOFILO DE MORO.

Moro ha descrito con este nombre un bacilo que ha aislado de las deposiciones de los niños alimentados a pecho, sembrando dicho producto en un medio a base de levadura de cerveza acidulado al 1% con ácido acético y cultivándolo a 37 grados.

Se trata de un germen que presenta una preferencia marcada por los medios de cultivo ácidos, de ahí el nombre con que se le designa.

Los elementos que lo representan son bastoncitos ordinariamente bastante cortos, que miden de 1,5 a 2 micrones de largo por 0,6 a 0,9 micrones de espesor, de extremidades libres ligeramente en punta, inmóviles, dispuestos a menudo en diplobacilos o en cadenas cortas. En los cultivos viejos o en anaerobiosis se encuentran a menudo formas más largas o aun filamentosas.

No presenta esporas.

Se colorea muy bien por el método de Gram; sin embargo, en los cultivos viejos los elementos se decoloran con facilidad.

Caracteres de los cultivos. — Es un germen especialmente aerobio que se desarrolla también, aunque con menos facilidad, al abrigo del aire. Su óptimum térmico es de 37°; no se desarrolla por bajo 22°.

Como lo hemos dicho, prefiere los medios ácidos. En placas de agar - mosto, de agar - glucosado, las colonias tienen el aspecto de pelotones de cabello que emiten en la periferia, prolongaciones muy finas, ramificadas que convergen hacia el centro para formar un núcleo oscuro. Los cultivos despiden un olor acético.

En agar corriente se desarrollan colonias delgadas, irregulares, transparentes, de bordes ondulados. Igual aspecto presentan en gelatina.

En caldo - mosto acidificado no produce enturbiamiento, depositándose un sedimento que asciende por agitación.

En leche el desarrollo es bastante lento; después de tres días se produce una coagulación que comienza por la parte inferior. Son frecuentes las formas de involución.

No hay crecimiento visible en papa. No produce indol ni reduce los nitratos.

Fermenta la glucosa, la levulosa, la lactosa, la galactosa, la maltosa, la sacarosa y la rafinosa con producción de ácidos en cantidad apreciable.

Viven en el intestino del hombre, donde se aclimata con facilidad y de donde es fácil aislarlo en el periodo de lactancia. No se encuentra en las deposiciones de los adultos.

ESTREPTOCOCOS LACTICOS.

Comprenden un conjunto de especies que en líneas generales, especialmente por sus propiedades metabólicas, pueden homologarse al enterococo, del cual algunos autores las consideran como variedades. Sin embargo, se diferencian fundamentalmente por la falta de virulencia y la no producción de endotoxina.

Son excelentes fermentos lácticos, que producen una tasa elevada de ácidos y que se aclimatan con gran facilidad en el intestino del hombre.

Mecanismo de acción. — Los fermentos lácticos ejercen frente a los microorganismos patógenos y a los gérmenes de las putrefacciones una acción antibiótica y antagónica marcadas. La utilización de los mismos en terapéutica, lo que constituye la bacterioterapia láctica, descansa sobre dos bases fundamentales: la una empírica, que es el empleo corriente de leches ácidas del tipo del yoghurt que, como productos de fermentación, contienen gran cantidad de microbios; la segunda, representada por la experimentación científica "in vitro" (antagonismo) e "in vivo" (antibiosis), que ha concluido que el principio activo bactericida de los fermentos lo cons-

tituye el ácido láctico derivado de la fermentación de los hidratos de carbono del medio, ácido que al estado naciente goza de dichas propiedades bactericidas y es al mismo tiempo organotropo.

Aplicaciones de los fermentos lácticos.—Es en la industria de la leche y de sus derivados, donde los fermentos lácticos encuentran aplicaciones que aumentan día a día. Es en la preparación de la manteca, de los quesos, etc., donde su papel es fundamental para la obtención de un sabor y de un aroma agradables. De aquí se han deducido sus importantes aplicaciones en productos lácteos con fines terapéuticos, como son la leche albuminosa, el babeurre, la leche acidófila, para no citar sino las más importantes.

Si recordamos la importancia que tiene la conservación del equilibrio entre las floras sacarolítica y proteolítica del intestino normal, se comprenderá que los fermentos lácticos estarán indicados en todos aquellos trastornos que derivan de la ruptura de dicho equilibrio, como son la enteritis y gastroenteritis agudas, las enterocolitis de la infancia, las diarreas de fermentación o de putrefacción, la constipación rebelde. Como coadyuvantes de tratamientos específicos pueden indicarse en los síndromas disentéricos de origen microbiano o parasitario, en la fiebre tifoidea, etc.

En todos estos casos los fermentos lácticos contribuyen a normalizar la flora intestinal y con ello las funciones del intestino evitando la producción de nuevas cantidades de sustancias tóxicas que son las responsables de estas enfermedades graves.

En el terreno de las afecciones supuradas el éxito obtenido en las observaciones de múltiples autores; no es más que la consecuencia lógica de sus propiedades frente a la flora patógena de supuración y justifica su empleo en grande escala. En efecto, los fermentos lácticos son bactericidas y organotropos, es decir, actúan destruyendo los gérmenes de infección, pero son absolutamente inofensivos para las células del foco aun cuando se empleen en forma prolongada y a concentraciones elevadas.

En los focos supurados su acción se manifiesta por tres series de fenómenos fundamentales:

1° Los agentes patógenos son destruidos, porque la acidez del medio impide todo metabolismo microbiano.

2° Las toxinas endógenas y las solubles se inactivan en forma

manifiesta, con lo cual se evitan los fenómenos locales y de intoxicación general.

3º La reacción alcalina del pus desaparece por el equilibrio que se establece entre los iones OH del foco y los iones H del cultivo de fermentos. Como consecuencia de lo anterior la reacción ácida perifocal que el organismo ha producido como elemento de defensa, no tiene razón de existir, la reserva alcalina vuelve a sus límites normales, la nutrición de los tejidos del foco se hace en condiciones fisiológicas, su actividad aumenta y con todo ello los procesos biológicos de cicatrización y epidermización se aceleran.

De lo anterior se deducen las grandes aplicaciones de los fermentos en las heridas operatorias supuradas, heridas contusas, abscesos, osteomielitis, úlceras atóxicas, panadizos, empiemas, etc. En Ginecología: en afecciones supuradas del cuello uterino, en las vulvovaginitis; en Urología: en las cistitis banales como en aquellas que complican la tuberculosis renal; en Obstetricia: en las infecciones puerperales, los resultados obtenidos permiten concluir que la bacterioterapia a base de fermentos es uno de los tratamientos racionales de los procesos supurados en general.

CAPITULO XXVII

GRUPO COLI Y OTRAS ESPECIES INTESTINALES

A este grupo pertenecen algunas especies de bacilos Gram negativos de 0,5 a 1 ó 2 micrones no esporulados, móviles o inmóviles que fermentan la lactosa y otros hidratos de carbono con formación de ácido y gas, coagulan la leche, forman indol en los medios peptonados, no licúan la gelatina y se encuentran en el intestino de la mayoría de los animales.

Pertenecen a este grupo:

Bacillus coli communis.

Bacillus coli communior.

Bacillus lactis aerogenes.

Bacillus acidi lactici.

Se clasifican también en este grupo otros gérmenes muy semejantes, pero que presentan algunos caracteres diferenciales respecto a sus propiedades fermentativas. Estos son:

Bacillus coli anaerogenes que se caracteriza por fermentar lentamente la lactosa (7 a 21 días) y sólo produce gas después de 2 ó 3 días de la fermentación en medios líquidos.

Bacillus para - coli. — No fermenta la lactosa.

Bacillus coli mutabile. — Los cultivos en medios sólidos lac-

tosados con rojo neutro muestran a los 3 ó 4 días la aparición de colonias hijas.

CARACTERES DIFERENCIALES

	Lactosa	Dulcita	Sacarosa	Salicina	Adonita	Glicerina	V. P.	R. M.	Gelatina	Indol
<i>B. coli communis</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>B. coli communior</i>	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>B. acidilactici</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+
<i>B. lactis aerogenes</i>	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+

REACCION DE VOGES - PROSKAUER Y REACCION DEL ROJO DE METILO

Estas reacciones son preconizadas por la escuela inglesa y americana para la identificación de los miembros del grupo Coli. Para estas reacciones se siembra el germen en estudio en el medio de Voges-Proskauer (agua peptonada al 1 % con glucosa al 1/2 % y fosfato bipotásico al 1/2 %). Incubar a 37 grados.

Reacción de Voges Proskauer. — Por la fermentación de la glucosa del medio, se forma además de los ácidos, acetil-metil-carbinol que es una substancia volátil reductora que cuando se mezcla con hidróxido de potasio en presencia de peptona se produce color rosado de eosina. La reacción se hace mezclando 5 c.c. de cultivo en el medio de Voges - Proskauer con 5 c.c. de solución acuosa de potasa al 10%. La reacción positiva (V. P. +) se manifiesta por color de eosina que se produce lentamente (12 horas) y se puede obtener instantáneamente agregando al cultivo una solución de alfa naftol. Se recomienda hacer la reacción con los cultivos de 24 horas, de 3 y 5 días.

Reacción del rojo de metilo. — A 5 c.c. del cultivo en el medio de Voges Proskauer de 4 ó 5 días de incubación a 37 grados se agrega 6 a 8 gotas de

solución acuosa de rojo de metilo al 1 x 5.000. La reacción positiva (R. M. +) se manifiesta por la aparición de un disco rojo en la superficie del líquido debido a la acidez del medio.

BACILO COLI COMMUNIS (BACILO COLI DE ESCHERICH)

GENERALIDADES

Se encuentra como saprófito en la boca y tubo digestivo del hombre y de la mayoría de los animales desde los primeros días del nacimiento, en la tierra, en las aguas contaminadas por excrementos, en el polvo, etc. Como patógeno produce septicemias, peritonitis, angiocolitis, colecistitis anginas, bronconeumonias, endocarditis, pericarditis, meningitis, pielonefritis, cistitis, prostatitis, salpingitis, metritis, flegmones gaseosos. Puede asociarse a otros agentes infecciosos (estreptococo, B. diftérico, B. disentéricos).

MORFOLOGÍA

Es un bacilo recto, de extremos redondeados, de 2 a 4 micrones de largo, Gram negativo, a veces toma coloración bipolar, posee 4 a 6 flagelos, su movilidad es muy variable según las razas.

CULTIVOS

Anaerobio facultativo, se desarrolla en todos los medios de cultivo corrientes entre 4 y 46 grados, temperatura óptima 37 a 38 grados. Los cultivos tienen olor fecaloideo.

Caldo. — Enturbiamiento rápido, desarrollo abundante, olor fecaloideo.

Agar. — Colonias planas grisáceas, de contorno liso o irregular. Se puede obtener la disociación en colonias "S" y "R" por envejecimiento, por cultivos en medios con antisuero homólogo, por adición de sales de litio a los medios de cultivo, y por acción del bacteriófago.

Gelatina. — Cultivo abundante. No hay licuefacción.

Leche. — Coagulación en masa en 1 a 3 días por formación de ácido láctico.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades sacarolíticas. — Fermenta la mayoría de los azúcares con producción de gas: lactosa, glucosa, levulosa, galactosa, maltosa, manita, glicerina. La fermentación de la lactosa constituye un carácter diferencial con el grupo tifo - paratífico y grupo disintérico que no la alteran.

Propiedades proteolíticas. — No licúa la gelatina, no digiere el suero coagulado, ni la albúmina de huevo. No disuelve el coágulo de la leche. Ataca la peptona de los medios de cultivo con producción de indol e indicios de H₂S.

Propiedades reductoras. — Tiene acción reductora enérgica (tubo B., caldo tornasolado, etc.).

Vitalidad. — En los cultivos el bacilo coli conserva su vitalidad durante 4 ó 5 meses. Muere por calentamiento a 60 grados durante 10 a 20 minutos. Resiste tres meses a temperaturas de 1 a 11 grados, pero las alternativas de congelación y de deshielo lo matan rápidamente. En el agua y la tierra vive 3 ó 4 meses. Muere rápidamente bajo la acción de la luz solar (20 minutos) y de los antisépticos, sublimado, fenol al 1 ó 2 por mil.

Virulencia.— Conserva largo tiempo su virulencia en los medios de cultivo.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Para tener valor, el examen bacteriológico debe efectuarse en el individuo vivo. El Colibacilo pulula en el cadáver pocas horas después de la muerte y aun durante la agonía.

En la sangre. — Se hará un hemocultivo. Observar durante varios días y sembrar en medios sólidos para su aislamiento e identificación. Tener presente la infección secundaria posible colibacilar en el curso de otra enfermedad infecciosa (fiebre tifoidea, por ejemplo).

Líquido céfalo - raquídeo. — Seguir la técnica indicada en las meningitis.

Exudados y pus. — Practicar previamente un examen directo: si hay pocos elementos microbianos proseguir el diagnóstico por cul-

tivo en la forma corriente, cuando la flora microbiana es muy abundante y variada (pus, orina purulenta, deposiciones, etc.). Se recomienda sembrar el producto patológico, previa dilución en suero fisiológico, en varias placas de Petri con **Agar lactosado tornasolado (medio de Würtz)**. A las 24 horas se observarán las colonias aisladas. El Colibacilo da colonias rojas (viraje del tornasol) por fermentación de la lactosa. Los gérmenes del grupo Tifo - paratífico y los disintéricos dan colonias azules (fermentación negativa).

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.

1º Siendo agente habitual de la infección cadavérica, su comprobación carece de significación en el cadáver.

2º En la sangre, en el individuo vivo, es siempre un hecho patológico. Asegurarse que no existe al mismo tiempo otro germen (B. tífico en particular).

3º Su presencia en órganos cerrados (pulmón, vesícula biliar, hígado, etc.), caracteriza una infección colibacilar.

4º En los órganos que albergan normalmente el colibacilo, la interpretación debe ser prudente; se afirmará cuando existe una lesión grosera (cistitis, angina) con desarrollo casi exclusivo del colibacilo. Para afirmar el diagnóstico bacteriológico, comprobar la presencia de anticuerpos específicos para el bacilo aislado en el propio suero del enfermo (aglutininas).

NEUMOBACILO DE FRIEDLAENDER

GENERALIDADES

Al estado normal el neumobacilo se encuentra frecuentemente en la boca y a veces en las fosas nasales, bronquios e intestinos.

Al estado patológico existe en todas las lesiones localizadas que provoca y, a veces, en la sangre. Al igual que el Colibacilo puede pasar del estado saprofito, que le es habitual, a provocar diversas manifestaciones patológicas: pleuresías, bronconeumonías, pericarditis, endocarditis, abscesos superficiales y profundos, meningitis, otitis, cistitis, etc. También es capaz de provocar infecciones generalizadas.

La virulencia del neumobacilo es muy variable. La tendencia suprativa en la inoculación experimental es marcada.

CARACTERES MORFOLÓGICOS Y DE LOS CULTIVOS

Bacilo o coco - bacilo traposo, rodeado de un cápsula muy visible. No toma el Gram (Gram negativo). Inmóvil. Sin cilios.

Se desarrolla fácilmente en los medios corrientes de cultivo. Anaerobio facultativo. El cultivo en gelatina por picadura da una imagen en clavo muy característica; no la licúa. En los otros medios sólidos (agar, suero coagulado, etc.) da colonias blancas, viscosas.

Fermenta la mayoría de los azúcares. No produce indol.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El examen directo (desgarro, pus, serosidad, falsas membranas) nos hará sospechar su presencia, cuando revele la presencia de un bacilo traposo, Gram negativo y capsulado. En todo caso será necesaria la identificación mediante los cultivos. El hemocultivo señalará una infección generalizada.

La no producción del indol y la cápsula permiten diferenciarlo rápidamente del Colibacilo.

Variedades del B. de Friedlander.

Los bacilos llamados del "Ozena" y del "Rinoescleroma", (**B. de Frisch**), son muy semejantes al B. de Friedlander.

El **Bacillus Lactis aerogenes** es muy vecino al neumobacilo, muy frecuente en la flora intestinal, fermenta los mismos azúcares que el B. de Friedlander con excepción de la dulcita y es un enérgico acidificador de la leche ("fermento láctico").

BACILLUS FECALIS ALCALIGENES

Es un huésped frecuente del intestino y por excepción puede hacerse patógeno. Un examen superficial puede inducir a error y confundirlo con el bacilo tífico. Es la posibilidad de ese error la que nos induce a conocer este germen.

Posee la mayoría de los caracteres del Bacilo de Eberth incluso la movilidad, pero no hace fermentar ningún azúcar, no produce

hidrógeno sulfurado e intensifica el color azul (alcalinidad) de los medios tornasolados. Los sueros aglutinantes para el B. tífico no aglutinan al B. Fecalis alcaligenes y viceversa. (Ver Bacilos tíficos).

BACILLUS PROTEUS (PROTEUS VULGARIS)

GENERALIDADES

Se halla muy esparcido en la naturaleza (agua, tierra, estercoleos, productos alimenticios alterados). Desempeña un papel importante en las putrefacciones (putrefacción cadavérica).

Saprófito casi constante del intestino del adulto, puede observarse, como germen de asociación en diversas infecciones intestinales cuyo pronóstico agrava siempre.

El Proteus es causa de infecciones intestinales, enteritis y diarreas infantiles (cólera infantil), intoxicaciones alimenticias, infecciones de las vías biliares y urinarias, etc. Es igualmente agente de supuraciones (peritonitis, pleuresías, artritis, otitis, sinusitis, etc.) y puede infectar úlceras y heridas. Se asocia, a veces, a los anaerobios, cuyo poder patógeno estimula. Produce flegmones que simulan la gangrena gaseosa (flegmones urinosos).

CARACTERES MORFOLÓGICOS Y DE CULTIVO

Morfología variable (cocobacilos, formas bacilares y filamentosas); muy móvil. Gram negativo.

Anaerobio facultativo. Se desarrolla fácilmente en todos los medios de cultivo, aun en aquellos desprovistos de albúminas.

Agar. — Sembrado en el líquido de condensación del agar aparece un velo invasor que cubre toda la superficie del medio.

Gelatina. — Licúa rápidamente la gelatina.

Agar - plomo. — Producción de Hidrógeno sulfurado.

Caldo. — Abundante desarrollo con producción de indol. Olor pútrido.

INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

Poder patógeno (variable según las cepas) para el conejo y el cuy. La inoculación subcutánea de 5 c.c. de un cultivo en caldo,

determina la formación de un absceso en el punto de inoculación, enflaquecimiento progresivo y muerte del conejo hacia el 4º día. Por vía peritoneal causa una afección caracterizada por diarrea, que después de provocar la caquexia termina por la muerte hacia el 8º día.

El cuy resiste mejor a la inoculación subcutánea.

A la autopsia de los animales se comprueban hemorragias en el tejido celular subcutáneo, exudado peritoneal, congestión intestinal, etc. (lesiones banales). El *Proteus* se puede aislar de las vísceras de los animales muertos por inoculación experimental.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Las infecciones humanas por *B. Proteus* pueden ser demostradas bacteriológicamente mediante la investigación del germen en los productos patológicos (*procedimiento directo*) y el diagnóstico serológico (*procedimiento indirecto*).

Investigación del *B. Proteus*. — **Cultivos.** — Se lo puede aislar de las deposiciones, de la orina, de la sangre, de las serosidades o del pus. Basta sembrar el material sospechoso en el agua de condensación de un tubo de agar inclinado que se mantiene vertical. Después de 24 horas a la estufa a 37º el *B. Proteus* recubre de un ligero velo blanquecino la superficie del medio. Proceder a su identificación.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.—Cuando el *B. Proteus* es aislado de la sangre su valor diagnóstico es indudable. Si se encuentra puro en una supuración se le considerará como el agente específico de ella. Su presencia normal en el intestino del adulto hace difícil la interpretación en ciertos casos; (es más fácil interpretar los resultados que se obtienen en el recién nacido porque el *B. Proteus* no forma parte de la flora normal de su intestino) Para confirmar el papel patógeno del *Proteus* en esos casos es preciso asociar los dos elementos diagnósticos: comprobación directa y abundancia del germen y, además, propiedad aglutinante del suero del enfermo para el *B. Proteus*. No se debe olvidar que este microbio pulula en el cadáver y que, por lo tanto, su hallazgo en él carece de importancia.

Diagnóstico serológico. — El suero de los enfermos atacados por el *Proteus vulgaris* goza de propiedades aglutinantes frente a una emulsión de este microbio.

VARIETADES DEL BACILLUS PROTEUS

Se han descrito numerosas variedades de *B. Proteus* que se diferencian por caracteres que no son específicos y que pueden ser fácilmente modificados (acción sobre los azúcares, acción sobre la gelatina, producción de indol, etc.).

BACILLUS PROTEUS X 19

Esta variedad se caracteriza porque es aglutinada por el suero de enfermos de tifus exantemático; mientras el suero de conejo inmunizado con el *Proteus vulgaris* aglutina otras razas de *Proteus* procedentes de distintos orígenes, el suero del tifooso actúa específicamente sólo frente a la raza X 19. Este hecho junto con la presencia de *Proteus* X 19 en la orina y en las deposiciones de estos mismos enfermos (Weil y Félix), indujo a atribuirle un rol etiológico en el tifus exantemático. Hoy esto no se acepta y no obstante, la reacción de aglutinación del *Proteus* X 19 por el suero diluido del enfermo (**Reacción de Weil - Félix**) se considera altamente específica en el diagnóstico del tifus exantemático. Se explicaría por la existencia de factores antigénicos comunes a la *Rickettsia* y al *Proteus* X 19.

FORMAS "O" y "H".

Los estudios de Weil y Félix sobre el *Proteus* X 19 demostraron la complejidad antigénica de este microbio, a partir del descubrimiento de dos variedades de colonias en los cultivos viejos de este germen, que no solamente difieren por sus caracteres morfológicos sino principalmente por sus caracteres serológicos.

Junto a colonias bien circunscritas, planas, regulares ("O" = ohne hauch = sin velo) se desarrollan otras colonias de crecimiento invasor, que se extienden rápidamente por la superficie del agar ("H" = hauch = velo). El examen microscópico "al fresco" de una emulsión de colonia "O" demuestra que está constituida por bacilos inmóviles, mientras que los de colonia "H" están dotados de gran movilidad.

Desde el punto de vista serológico existen diferencias no menos interesantes: la inoculación experimental de colonia "O" produce un suero que da el tipo fino de aglutinación (granular), mientras que el suero obtenido con la forma "H" da el tipo de aglutinación de grumos gruesos (flocular).

La prueba de Castellani demuestra que el tipo "O" adsorbe solamente las aglutininas "O", mientras que el tipo "H" adsorbe las de ambas variedades; en efecto, la inoculación de la forma "H" produce un suero mixto, de modo que si este suero se coloca en presencia de la forma "O", la aglutinación es positiva, pero con los caracteres de aglutinación granular.

Antigénicamente, pues, la forma "H" está constituida por los antígenos o receptores de las dos variedades, ya que es capaz de provocar su aparición en el suero de los animales preparados y de adsorberlas por la prueba de Castellani.

También los antígenos "H" y "O" tienen propiedades diferentes: el antígeno "H" es termolábil y el antígeno "O" es termoestable.

Basándonos en esta nueva diferencia, podemos demostrar que la colonia "H" posee ambos antígenos: si después de un calentamiento a 80° durante 1 hora ponemos en presencia de su antisuero respectivo una emulsión de colonia "H", ésta aglutinará, pero solamente en la forma granular fina característica del antígeno "O"; el antígeno "H" (que aglutina en gruesos flóculos) ha sido destruido por el calor.

Al contrario de los antígenos, la aglutinina "H" es termoestable y la aglutinina "O" es termolábil.

Teniendo en cuenta que las colonias "O" están constituidas por gérmenes inmóviles (desprovistos de cilios), se ha pretendido que el antígeno "O" radicaría en el endoplasma microbiano (*antígeno somático*) mientras que el antígeno "H" de las colonias móviles y ciliadas sería ectoplasmático (*antígeno ciliar*). Esto explicaría que los gérmenes de la variedad "H" tuvieran ambos antígenos: somático y ciliar. Por lo tanto, no pueden existir colonias que posean exclusivamente antígeno "H" o ciliar.

(Para un estudio más completo, consultar Capítulo XXX, Salmonellosis).

Preparación del antígeno "O". — Selecciónese las colonias menos móviles hasta obtener colonias de gérmenes inmóviles o bien cultívese el germen en agar fenolado hasta obtener colonias lisas ("S") e inmóviles. Las suspensiones muertas de antígeno "O" se preparan mediante el calor o el alcohol absoluto (destrucción del antígeno "H").

Preparación del antígeno "H". — Es más difícil de obtener (suspensión flagelar pura); el procedimiento consiste en agitación prolongada y centrifugación de un germen móvil.

En la práctica se usa el antígeno "OH" estandarizado y muerto en las reacciones de aglutinación para evitar los peligros del antígeno vivo.

Obtención de suero anti "O". — Inocúlese al conejo con emulsión de gérmenes "O".

Obtención de suero anti "H". — Prepárese suero mixto y saturese las aglutininas "O".

CAPITULO XXVIII

GRUPO TIFICO PARATIFICO

GENERALIDADES

Las fiebres tifoidea y paratifoideas tienen como agentes etiológicos al B. de Eberth (*B. typhosus*) y a los bacilos paratíficos A y B.

Se encuentran en los enfermos de fiebre tifoidea o paratifoidea en el bazo, hígado, ganglios mesentéricos, folículos cerrados del intestino en la médula ósea, en la sangre, en las manchas hemorrágicas de la piel, en el contenido intestinal, en la bilis y orina. Se les encuentra también en las complicaciones de la fiebre tifoidea, anginas, rinofaringitis, bronconeumonías, abscesos, osteítis, adenitis, pleurexías, pericarditis, meningitis, donde se comportan como un germen piógeno.

Se los puede aislar del contenido intestinal de los convalecientes o de los portadores sanos que son los individuos que han estado en contacto de enfermos de tifoidea o paratifoidea.

También viven en las aguas, hielo, leche, ostras, tierra y en el polvo de las habitaciones de los enfermos.

El grupo tífico - paratífico está formado por microorganismos que tienen ciertos caracteres comunes: "bacilos de extremos redondeados, Gram negativos, no esporulados, dotados de numerosos cilios, móviles, se desarrollan fácilmente en los medios ordinarios, anaerobios facultativos, no licúan la gelatina, enturbian el caldo, dando ondas "moirées" sin formar velos; no fermentan la lactosa ni la sacarosa, no coagulan la leche, no producen indol".

CULTIVOS

Son anaerobios facultativos. Se desarrollan en los medios de cultivo corrientes entre 4º y 46º.

Caldo. — Enturbiamiento homogéneo, ondas "moirées".

Agar. — Colonias brillantes, ligeramente azuladas y transparentes las de B. de Eberth; más opacas las de B. paratíficos. Con frecuencia en los cultivos viejos de B. de Eberth o por los artificios de técnica conocidos puede inducirse la disociación microbiana en colonias "S" y "R" que poseen las características ya conocidas; las colonias "S" son redondas, de bordes netos, salientes y traslúcidas. Las colonias "R" son de bordes dentados, más planas, de superficie irregular, ligeramente opacas; estas colonias "R" corresponden a la antigua descripción "en montaña nevada".

Leche. — No la coagulan.

Gelatina. — No la licúan.

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades sacarolíticas. — No fermentan la lactosa. El B. de Eberth fermenta sin producción de gas la glucosa, levulosa y galactosa, manita y maltosa.

Los B. paratíficos A y B fermentan los mismos azúcares que el B. de Eberth pero con producción de gas.

Propiedades proteolíticas. — El B. de Eberth y B. paratíficos A y B no producen indol.

Propiedades reductoras. — El B. de Eberth no tiene propiedades reductoras. El B. paratífico A posee o no posee propiedades reductoras. El B. paratífico B es muy reductor.

Los caracteres diferentes se resumen en el cuadro siguiente:

Caracteres diferenciales	B. Tífico	B. paratífico A	B. paratífico B
Cultivo en Tubo B.	Gas — Reducción — Tinte amaranto	Gas + Reducción ligera Tinte amaranto	Gas ++ Reducción intensa Fluorescencia
Cultivo en Agar-plomo. (H ₂ S)	++	—	+
Cultivo en papa:	Desarrollo escaso	Idem.	Capa café-amari- lenta espesa
Aglutinación:			
Suero anti-Eberth	Aglutina	No aglutina	No aglutina
" anti-Para A	No aglutina	Aglutina	No aglutina
" anti-Para B	No aglutina	No aglutina	Aglutina

Vitalidad. — Son gérmenes que tienen larga vitalidad: en los cultivos viven 3 ó 4 meses. Se destruyen por calentamiento a 60º en 20 ó 30 minutos; a 53º, en una hora. A temperaturas de 1º a 11º se conservan vivos por muchos meses. En el agua o en la tierra se mantienen vivos 5½ meses. La luz solar y los antisépticos los matan rápidamente.

Virulencia. — Muy variable, puede exaltarse por pasajes en serie en animales de laboratorio.

INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de las fiebres tifoidea y paratifoideas está basado en la investigación del bacilo en el organismo y en la existencia de anticuerpos específicos en el suero del enfermo.

1º *Investigación del agente etiológico en el organismo.*

Hemocultivo. — La investigación del grupo Tifo - paratífico en la sangre puede efectuarse desde los primeros días de la enfermedad y se hace más fácilmente cuanto menos avanzada esté, ya que los gérmenes pueden persistir en la circulación incluso hasta la cuarta semana.

La práctica del hemocultivo consta de la extracción de 5 a 10 c.c. de sangre por punción venosa; la siembra en un medio de cultivo apropiado y, por último, la identificación del microbio. Es recomendable, para el buen éxito del hemocultivo, sembrar la sangre en gran cantidad de caldo (300 a 500 c.c.), con el objeto de diluir lo más posible los anticuerpos normales (aglutininas, poder bactericida, etc.), que retardan o inhiben el desarrollo.

Llevar el matraz a la estufa a 37 grados; examinar el contenido al cabo de 24 horas. Si el examen es negativo, agitar el matraz para favorecer el cultivo y llevar nuevamente a la estufa; repetir el examen diariamente, pues es frecuente que el hemocultivo aparezca positivo (caldo turbio, examen en gota colgante) sólo al tercero o cuarto día. El desarrollo se retarda a menudo por la acción inhibidora de la sangre (poder bactericida) y en otras ocasiones el caldo se observa límpido, y sin embargo en el fondo del matraz hay grumos constituidos de cuerpos bacilares aglutinados (aglutininas de la sangre sembrada).

Para el examen del hemocultivo se procede a hacer una coloración de Gram y una gota colgante con el líquido turbio o del fondo del matraz, con lo cual se orientará inmediatamente con respecto a la existencia de gérmenes, su morfología, su colorabilidad, su movilidad, etc. Para llegar a un diagnóstico de certidumbre es necesario aislar puro el germen, sembrando en medios sólidos por dilución o identificar por los procedimientos corrientes (caracteres de cultivo, bioquímicos, etc.), o mejor, para hacerlo más rápido, mediante los sueros aglutinantes específicos. No hay que olvidar que existen infecciones mixtas a B. tífico, paratíficos y Coli.

Urocultivo. — La eliminación de los bacilos por la orina no se efectúa sino después de los 15 ó 20 días y no es contante, por lo cual no debe considerársele como medio práctico de diagnóstico.

Bilicultivo. — Los gérmenes persisten en la bilis largo tiempo después de su desaparición de la sangre y, por consiguiente, el bilicultivo es un procedimiento eficaz para descubrir los "portadores convalecientes o crónicos". El procedimiento consiste en sembrar en diversos medios la bilis obtenida por sondaje duodenal.

Coprocultivo. — El aislamiento de los bacilos tíficos y paratíficos de las deposiciones presenta grandes dificultades, por hallarse

mezclados a numerosas especies microbianas, particularmente al Colibacilo, que invaden los medios sembrados. Se han preconizado multitud de medios y de técnicas (antisépticos, medios electivos, etc.), pero el procedimiento a recomendar es el siguiente:

Aislamiento en placas de Agar lactosado tornasolado (**Medio de Würtz**). Este procedimiento es aplicable en la investigación y diagnóstico de todos los casos de infecciones intestinales: Colibacilo, grupo Tifo - paratífico, B. de Morgan, bacilos disentéricos, etc. Constituye, pues, un método general de examen bacteriológico de las deposiciones y por este motivo conviene conocerlo con cierto detalle.

1º Recoger las deposiciones en una placa de Petri estéril y practicar el examen tan pronto como sea posible, pues toda tardanza favorece el desarrollo de los saprófitos y falsea los resultados.

2º Examinar al microscopio las deposiciones para orientarse en cuanto a la cantidad de gérmenes: a mayor número, mayor debe ser la dilución.

3º Diluir en suero fisiológico para obtener, después de agitar enérgicamente, una emulsión ligeramente turbia (emulsión A).

4º Agregar a un nuevo tubo de suero fisiológico unas cuantas gotas de emulsión A hasta obtener, previa agitación, una emulsión apenas visible (emulsión B).

5º Dejar caer una gota de la emulsión B sobre un punto periférico del Agar lactosado tornasolado (placa de Petri) y extender dicha gota mediante una espátula estéril o una pipeta Pasteur triangular sobre toda la superficie del medio.

6º Sin recargar nuevamente la espátula o la pipeta, sembrar una segunda placa de Petri con Agar lactosado tornasolado. Ambas placas llevarlas a la estufa a 37 grados y observar a las 24 horas.

En esas condiciones será posible encontrar entre las colonias rojas de Colibacilos (fermentan la lactosa), colonias azules del grupo Tifo - paratífico, disentérico, etc.

Para el diagnóstico definitivo de la especie es necesario, a partir de una colonia azul que se siembra en distintos medios hasta obtener un desarrollo seguramente puro, proceder a la identificación por los procedimientos corrientes y especialmente mediante los sueros aglutinantes.

2º Suero - diagnóstico.

Durante la segunda semana de enfermedad, después de los diez

días de iniciada, es posible hacer el diagnóstico por la investigación de las aglutininas específicas contenidas en la sangre del enfermo. Es el **suero-diagnóstico de Widal**.

TÉCNICAS:

I.—Preparar el siguiente material:

1º Tres cultivos de 24 horas sobre agar de Bacilo de Eberth, de Bacilo paratífico A y de Bacilo paratífico B.

2º El suero de un enfermo obtenido por coagulación de algunos centímetros cúbicos de sangre extraídos asepticamente.

3º Tres series de cuatro tubos de hemolisis dispuestos en un porta-tubos.

4º Dos pipetas Pasteur estériles, del mismo calibre.

Operar de la siguiente manera:

Preparar las emulsiones microbianas disociando cuidadosamente el cultivo en suero fisiológico.

Preparar con suero fisiológico una dilución al 1/10 del suero del enfermo en estudio.

Repartir las emulsiones y el suero del enfermo de la siguiente manera: la primera corrida de tubos recibirá la emulsión Eberth; la segunda, la emulsión Para A; la tercera, la emulsión Para B. Lavar cuidadosamente la pipeta en agua fisiológica al pasar de una emulsión a otra.

Para cada una de estas emulsiones agregar:

en el primer tubo:	16 gotas,
en el segundo tubo:	18 gotas,
en el tercer tubo:	19 gotas, y
en el cuarto tubo:	20 gotas.

distribuyendo después con la pipeta gemela que proviene del estiramiento a la llama de un mismo tubo de vidrio, el suero diluido al 1/10, de la siguiente manera:

1º tubo:	4 gotas,
2º tubo:	2 gotas,
3º tubo:	1 gota,
4º tubo:	0 gota.

Se tiene así una dilución del suero a los títulos siguientes:

1º tubo:	1 por 50,
2º tubo:	1 por 100,
3º tubo:	1 por 200,
4º tubo:	control o testigo.

Si se desea investigar la aglutinación a títulos más elevados, continuar la escala de los tubos hacia la derecha con las mismas cantidades de emulsiones:

16, 18, 19 gotas, pero con el suero diluido al 1/100. Se obtendrá así los títulos siguientes: 1 por 500, 1 por 1000 y 1 por 2000.

Los tubos son mantenidos a temperatura de laboratorio y la lectura de la aglutinación se hará por el procedimiento microscópico o por el macroscópico.

II.—Puede emplearse, también, la técnica siguiente, cuyo fundamento es exactamente igual al de la que acabamos de describir, de la que se diferencia únicamente por el volumen de los elementos que se emplean.

En esta reacción intervienen:

a) *El antígeno*.

b) *El anticuerpo* (aglutininas), contenido en el suero del enfermo a investigar.

c) *Suero fisiológico*, que va a actuar como electrolito.

Se disponen 6 tubos de hemolisis y a los 5 últimos se les agrega 1 c.c. de suero fisiológico. Se diluye el suero del enfermo al 1 x 25 agregando 0,25 c.c. de suero a 6 c.c. de suero fisiológico, ya que la aglutinina a investigar va a ser el elemento variable de la reacción. Se agrega 1 c.c. de esta dilución al primero y al segundo tubos. En este último tendremos las aglutininas diluidas al 1 x 50, dado que ya existían en él 1 c.c. de suero fisiológico. Se mezcla intimamente con pipeta y se deposita 1 c.c. de esta mezcla en el tercer tubo, en el cual tendremos una dilución de los anticuerpos al 1 x 100. Se procede como en el anterior y se continúa en esta forma, evitando agregar al último tubo la dilución del anticuerpo, pues dicho tubo va a actuar como control.

Se termina la reacción agregando 1 c.c. de la emulsión del antígeno a cada tubo. En estas condiciones tendremos una dilución final al 1 x 50 en el primer tubo, al 1 x 100 en el segundo, al 1 x 200 en el tercero, al 1 x 400 en el cuarto y al 1 x 800 en el quinto. No hay dilución de suero en el control.

Procedimiento microscópico. — Permitirá una lectura rápida ya que es posible que a los 20 minutos de contacto aún a la temperatura del laboratorio se pueda observar entre lámina y laminilla un doble fenómeno: la pérdida de la movilidad y la presencia de conglomerados microbianos (aglutinación). Es preciso comparar siempre con la emulsión testigo o control.

Procedimiento macroscópico. — Dejar los tubos a la temperatura del laboratorio durante 24 horas o en la estufa a 37º durante 6 horas. Durante este tiempo se forman grumos más y más gruesos que se van depositando en el fondo de los tubos. La lectura se hará en un aglutinoscopio o por lo menos sirviéndose de una iluminación tangencial. Se podrá observar dos órdenes de fenómenos:

a) *Aclaramiento de la emulsión*, que en lugar de hallarse opalescente, como en el tubo control, se ve límpida como el agua.

b) Sedimentación de los microbios que por agitación de los tubos ponen de manifiesto los grumos perfectamente visibles.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.—El diagnóstico es fácil si la aglutinación se produce para uno solo de los gérmenes utilizados.

Debe considerarse útil para el diagnóstico cuando al haber aglutinación para las tres especies microbianas, el título de una de ellas es seis veces superior que el título de las restantes.

Cuando la aglutinación para las tres especies es a títulos semejantes o muy vecinos, hay que concluir de que hay presencia de **coaglutininas** o bien de que se tratarían de aglutininas específicas por **infecciones mixtas** tífico - paratífica. El diagnóstico en estos casos no podrá efectuarse sino mediante **la prueba de la saturación de las aglutininas de Castellani**.

La suero-aglutinación es considerada como positiva en la interpretación clínica a partir 1 por 50 para el Eberth y Para A y al 1 por 100 como título mínimo en el Paratifo B.

En los individuos vacunados por vía subcutánea con la vacuna preventiva TAB, la inmunización determina la formación de aglutininas idénticas a las provocadas por la infección, lo que deberá tenerse presente para evitar un grave error de diagnóstico.

CAPITULO XXIX

BACILOS DISENTERICOS

La disentería bacilar es una colitis ulcerosa específica debida a la acción de los gérmenes que pertenecen al grupo disentérico y que se encuentran localizados en el intestino grueso de los enfermos, donde producen ulceraciones características, como también se hallan en los ganglios mesentéricos. No se generalizan. Los principales miembros de este grupo son agentes patógenos que producen cuadros disenteriformes, caracterizados por la emisión frecuente de deposiciones (20 a 30 diarias) que contienen sangre, mucus y pus, acompañadas de tenesmo. Los bacilos disentéricos se pueden diferenciar de otros grupos de gérmenes intestinales por la falta de movilidad, por fermentar los hidratos de carbono sin producción de gas y por las reacciones serológicas. Se hallan en las deposiciones de los enfermos y convalecientes, donde a veces persisten por algunos meses (portadores de gérmenes); se les puede encontrar, en el curso de las epidemias, en individuos que han estado en contacto con los enfermos sin haber presentado síntomas disenteriformes.

Los bacilos disentéricos son: el **B. de Shiga**, que es el más típico y produce los cuadros más graves, el **B. de Flexner**, el **B. de Hiss** y el **B. de Strong**, considerados por la escuela inglesa como un solo grupo (Andrews e Inman), que comprenden 5 tipos serológicos: V, W, X, Y y Z; el **B. de Schmitz** y el **B. de Sonne**.

Estos gérmenes tienen los siguientes caracteres comunes: bacilos de extremos redondeados, de 1 a 2 micrones; inmóviles, sin cilios; sin esporas; Gram negativos. Se desarrollan en los medios de cultivo

corrientes. Temperatura óptima: 37 grados. No fermentan la lactosa; fermentan la glucosa y otros azúcares (variables según las especies) sin producción de gas; en tubo B. producen color amaranto sin gas; no producen H₂S; no coagulan la leche, no licúan la gelatina; en agar desarrollan colonias grisáceas, pequeñas, semi-transparentes; en caldo producen enturbiamiento uniforme.

Después de las observaciones anteriores de Baerthlein, Arkwright demostró, como ya se comprobó para los bacilos tíficos y paratíficos, vibrión colérico, etc., que también las colonias de bacilos disintéricos cultivados en agar pueden revestir dos aspectos diferentes: unas lisas "S" (smooth), las otras rugosas "R" (rough).

Esta disociación puede presentarse espontáneamente en los cultivos viejos o puede provocarse por artificios de técnica. Los dos tipos de colonias tienen las características anotadas en el párrafo de disociación o variación microbiana (Cap. VI). En la variación lisa-rugosa se produce el consiguiente cambio en la constitución de su antígeno "O" en "Ö".

PROPIEDADES BIOQUÍMICAS

Propiedades sacarolíticas. — El B. de Shiga fermenta sin producción de gas la glucosa y la dextrosa; no fermenta la manita ni la maltosa (algunas razas). No fermenta la sacarosa ni la lactosa. El bacilo de Strong fermenta la glucosa, la maltosa y la sacarosa y, a veces, la manita y la arabinosa.

Propiedades proteolíticas. — Los disintéricos no digieren la carne, la caseína, la ovo-albúmina, ni el suero coagulado; no forman H₂S. No tienen acción hemolítica. El bacilo de Shiga no forma indol, algunas razas del grupo Flexner-Hiss producen indol, el bacilo de Strong produce siempre indol.

Vitalidad. — Los B. disintéricos son poco resistentes; sus cultivos pierden su vitalidad en tres o cuatro semanas. La desecación y la acción de la luz solar los destruye rápidamente. Resisten menos de una hora al calentamiento a 58 grados.

Virulencia. — La virulencia del bacilo de Shiga se conserva en los cultivos durante años; si sufren muchos pasajes por estos medios

pierden su propiedad de producir las lesiones intestinales características, pero matan al animal por toxicidad.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

El B. de Shiga inoculado a los conejos por cualquier vía, se localiza gracias a su "virulencia electiva", en el intestino grueso. El animal muere en 24 ó 48 horas. A la autopsia se encuentra una enteritis hemorrágica con exudado pseudomembranoso. Las placas de Peyer se presentan aumentadas de volumen y hemorrágicas y la mucosa cubierta con falsas membranas. El germen puede aislarse del exudado, de las ulceraciones y de los ganglios mesentéricos que se encuentran congestionados y aumentados de volumen.

Si los animales sobreviven cuatro o más días, pueden presentarse deposiciones muco-sanguinolentas y parálisis de las extremidades posteriores.

La inoculación de cultivos muertos o filtrados de B. de Shiga tienen el mismo poder patógeno que los cultivos vivos: inyectados a los animales sensibles producen los mismos síntomas y las mismas lesiones; esto demuestra que el B. de Shiga actúa por toxicidad.

Los bacilos disintéricos del grupo Flexner-Hiss, B. de Strong, B. Schmitz y B. de Sonne, carecen prácticamente de acción patógena. Solamente grandes dosis por inoculación intravenosa, subcutánea o intraperitoneal son capaces de reproducir la disenteria experimental.

B. DE SCHMITZ (B. AMBIGUS B. PARASHIGA)

Es un agente de disenteria bacilar, morfológica y culturalmente muy parecido al B. de Shiga; se diferencia de él en que algunas razas fermentan la maltosa, muchas producen indol, no es aglutinado por antisuero Shiga y es menos patógeno para los animales de laboratorio. En el conejo sólo produce la muerte con ulceraciones intestinales típicas cuando se inoculan grandes dosis directamente en el intestino.

B. DE SONNE (B. DE DUVAL B. DISPAR)

Es un disintérico que se diferencia de los anteriores porque tardíamente coagula la leche. Se le caracteriza por las pruebas serológicas

y por la aparición de colonias hijas (en los cultivos en agar de Würtz) donde fermenta la lactosa después de tres o cuatro días. Además, fermenta la glucosa, la manita y la maltosa. Produce indol. Inoculado a los conejos, produce cuadros disenteriformes.

	Manita	Malto- sa	Saca- rosa	Lactosa	Indol	Suero Shiga	Suero Flex. Hiss	Suero Strong	Suero Schmitz	Suero Sonne
<i>Shiga-Kruse</i>	—	—	—	—	—	+	—	—	—	—
<i>Flexner-Hiss</i>	+	+	—	—	+	+	+	—	—	—
<i>Strong</i>	+	+	+	—	+	—	—	+	—	—
<i>Schmitz</i>	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—
<i>Sonne</i>	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El diagnóstico bacteriológico de las disenterias bacilares se hace, principalmente, por la investigación de los bacilos disentéricos en las deposiciones y por la investigación del poder aglutinante del suero de los enfermos.

1) Examen de las deposiciones.

a) *Examen macroscópico.* — Las deposiciones disentéricas se caracterizan por su consistencia semi-líquida, por su aspecto mucopurulento y por la presencia frecuente de un punteado sanguinolento.

b) *Examen microscópico.* — Hacer un examen directo y otro por coloración de deposiciones frescas. Estos exámenes permiten comprobar la presencia de bacilos inmóviles, Gram negativos y gran cantidad de elementos celulares. En la disentería bacilar predominan los leucocitos polinucleares en proporción de 80 a 90 por ciento; en cambio en la disentería amebiana los elementos celulares son poco numerosos y predominan los linfocitos en proporción de 70 a 80 por ciento; los polinucleares son más escasos (20 ó 30 por ciento). El examen en fresco sirve también para descartar la presencia de amebas disen-

téricas, también con deposiciones recién emitidas, pues en pocas horas los demás gérmenes de la flora intestinal se multiplican abundantemente, dificultando el aislamiento de los bacilos disentéricos. Si las muestras se mandan a laboratorios muy distantes, es recomendable mezclar las deposiciones recién emitidas con glicerina diluida en suero fisiológico al 30 por ciento; la glicerina retarda el desarrollo de los gérmenes secundarios.

El procedimiento recomendado consiste en sembrar en placas de Petri con agar lactosado y tornasolado. Con el asa de platino se toma una porción de mucosidad y se lava dos o tres veces en suero fisiológico; se emulsiona en otro tubo de suero fisiológico. Se toma una gota de emulsión y se extiende en una o dos placas de agar lactosado tornasolado. Se llevan los cultivos a la estufa a 37 grados y se observan a las 20 ó 24 horas y se procede a la identificación de las colonias azules sospechosas, por los cultivos y pruebas de aglutinación, estudiando separadamente tres o cuatro de ellas para mayor seguridad. Los sueros de los enfermos y animales inmunizados con B. de Shiga aglutinan al B. de Shiga y tienen coaglutininas para el grupo Flexner-Hiss, no poseen coaglutininas para los B. Schmitz y de Sonne ni para los B. tíficos y paratíficos. Los sueros Flexner-Hiss no tienen coaglutininas para el B. de Shiga, B. Schmitz ni B. de Sonne.

2) Suero - diagnóstico.

Solamente puede investigarse la presencia de aglutininas en el suero a partir del octavo o décimo día de la enfermedad, siendo, por consiguiente, un diagnóstico tardío. El suero-diagnóstico es empleado también para afirmar retrospectivamente una infección disentérica hasta dos o tres meses después de la enfermedad, y para el diagnóstico de las disenterias bacilares crónicas.

Como los sueros normales pueden aglutinar el tipo Shiga hasta 1 x 30 — 1 x 40, y los tipos atóxicos hasta 1 x 100, es oportuno hacer las pruebas con los sueros sospechosos desde 1 x 50 para el Shiga, y 1 x 150 para los demás.

Cuando el suero es aglutinante para más de un tipo hay que pensar en co-aglutininas o bien en infecciones mixtas. Para orientarse precisa en tales casos la prueba de Castellani, de saturación de las aglutininas.

CAPITULO XXX
SALMONELLOSIS
INTOXICACIONES ALIMENTICIAS

GENERALIDADES

Se ha designado bajo el nombre genérico de "Salmonellas", un gran número de bacilos que no toman el Gram y que no esporulan; flagelados en su mayoría, su tamaño habitual es 0,4 a 3 micrones. Los flagelos en ciertas condiciones de cultivo pueden desaparecer pasajera o definitivamente como en las formas "O". Fermentan la glucosa casi siempre con producción de gas. No fermentan la lactosa ni la sacarosa, no licúan la gelatina, no coagulan la leche, ni producen indol. Todas las especies conocidas son patógenas para el hombre, para los animales o para ambos.

El estudio de la estructura antigénica de este grupo (Smith, Weil, Félix, Andrewes, Arkwright) y su aplicación práctica al diagnóstico y diferenciación de las especies del grupo y al sero-diagnóstico ha hecho posible clasificar estos gérmenes sobre bases serológicas más exactas que las propiedades fermentativas. Al mismo tiempo la clasificación serológica permite establecer relaciones antigénicas entre algunas especies que presentan diferentes caracteres culturales y bioquímicos y que producen procesos clínica y epidemiológicamente diferentes.

Procesos clínicos. — Los gérmenes de este grupo pueden producir dos clases de cuadros clínicos diferentes en el hombre y en los animales:

- a) *Fiebre tifoidea y paratifoidea* caracterizadas por el síndrome tífico, por su larga incubación, fiebre continua, septicemia, etc.
- b) *Gastro-enteritis o intoxicaciones alimenticias*, enfermedades con período de incubación corto, síndrome de diarrea, cólicos, vómitos; la septicemia es excepcional.

CLASIFICACION.

La clasificación de Kauffmann - White (propuesta por la Comisión de Nomenclatura de la Sociedad Internacional de Microbiología), se funda en el conocimiento de la estructura antigénica de los gérmenes de este grupo y en la existencia de dos antígenos en las especies móviles. Todos los representantes flagelados (móviles) del grupo están constituidos serológicamente de antígeno somático "O", termoestable, contenido en el cuerpo microbiano y del antígeno ciliar "H", termolábil, contenido en los flagelos. Las cepas no flageladas sólo contienen antígeno "O". En la preparación de sueros en animales, los antígenos "H" y "O" producen sus aglutininas homólogas (aglutininas "O" y "H"). La aglutinina "O" sólo actúa sobre el antígeno "O" de los bacilos y produce su aglutinación; los flagelos permanecen móviles, lo que se puede evidenciar al microscopio. Macroscópicamente se observan en el líquido grumos finos (aglutinación granular). Las aglutininas "H" sólo actúan sobre el antígeno "H"; los flagelos se inmovilizan y se adhieren unos a otros, el líquido se observa turbio y con grandes grumos (aglutinación flocular). Cuando existen juntos los antígenos y aglutininas "O" y "H", la aglutinación "OH" puede producirse simultáneamente. La aglutinación "H" se produce mucho más rápidamente (media hora a la temperatura ambiente), que la aglutinación "O" (dos horas a 37 grados y 24 horas a la temperatura ambiente). Los grumos de la aglutinación "H" se disgregan fácilmente al moverlos, mientras que la aglutinación "O" es permanente.

Los cultivos de algunas Salmonellas presentan reacciones aglutinantes, ya sea frente a un suero de su especie (gérmenes en *fase específica*) o a un suero de su grupo (germen en *fase inespecífica o de grupo*). El antígeno ciliar "H" es responsable de estas variaciones de fase.

En la clasificación de Kauffmann - White los tipos con antígeno "O" total o parcialmente idénticos se reúnen en cinco sub-grupos: A, B, C, D y E. Los antígenos termoestables o antígenos "O" se designan con números romanos: I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X. Los antígenos termolábiles "H" en su fase específica se designan con las letras minúsculas: a, b, c, d, e, f, g, etc., y los antígenos termolábiles "H" en su fase no específica, se designan con los números arábigos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6. (Ver el cuadro).

Para identificar un germen sospechoso de Salmonella, se procede previa-

mente a verificar las pruebas bioquímicas para establecer si se puede incluir en el género *Salmonella*. El carácter de especie se establece por las pruebas serológicas. Se empieza por designar el grupo a que pertenece el germen en estudio haciendo las pruebas de aglutinación con los 10 sueros "O". La especie dentro de cada grupo se identifica por las pruebas de aglutinación con sueros "H" en sus fases específica y no específica.

Ejemplo: Supongamos un germen que por las pruebas de aglutinación con suero "O" pertenece al grupo D, lo que significa que presenta un antígeno "O" IX. Diremos que se trata de un bacilo tífico cuando sólo presenta aglutinina "H" específica d y no presenta fase "no específica" de aglutinación "H".

La técnica moderna siempre recomienda hacer las pruebas bioquímicas conjuntamente con las pruebas serológicas.

ESQUEMA KAUFFMANN - WHITE, ACEPTADO POR LA COMISIÓN DE NOMENCLATURA DE LA SOCIEDAD INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGÍA

Grupo	E S P E C I E S		Antígeno O	ANTIGENO H	
				Específico	No especif.
A	1	S paratyphi A	I, II.	a	—
	2	S senftenberg	I, III	gs	—
	3	S senftenberg, var. newcastle		gs	—
B	4	S paratyphi B	IV, V.	b	1,2
	5	S typhi murium		i	1,2,3
	6	S typhi murium, var. binns		—	1,2,3
	7	S stanley		d	1,2
	8	S heidelberg	r	1,2,3	
	9	S reading	IV	eh	1,4,5
	10	S derby		fg	—
	11	S abortus-equi		enx	—
	12	S abortus ovis		c	1,4,6
	13	S brandenburg		enlv	—
C	14	S paratyphi C	VI, VII	c	1,4,5
	15	S cholerae suss		c	1,3,4,5
	16	S cholerae suis var. kuzendorf		—	1,3,4,5
	17	S typhisuis		c	1,3,4,5
	18	S typhisuis, var. voldagsen		—	1,3,4,5
	19	S thompson		k	1,3,4,5
	20	S thompson, var. berlin		—	1,3,4,5
	21	S virchow		r	1,2,3
	22	S oranienburg		mt	—
	23	S potsdam		enlv	—
	24	S bareilly		y	1,4,5
D	25	S newport	VI, VIII	eh	1,2,3
	26	S newport, var. kottbus		eh	1,3,4,5
	27	S newport, var. puerto-rico		—	1,2,3
	28	S morbificans bovis		r	1,3,4,5
	29	S muenchen		d	1,2
D	30	S typhi	IX.	b	—
	31	S enteritidis		gom	—
	32	S enteritidis, var. danysz		gp	—
	33	S enteritidis, var. dublin		gpu	—
	34	S enteritidis, var. rostock		gop	—
	35	S enteritidis, var. moscú		a	1,4,5
	36	S sendai		enlv	—
	37	S dar-es-salaam		eh	1,3,4,5
	38	S eastbourne		lv	1,3,4,5
	39	S panamá		—	—
	40	S gallinarum		—	—
E	41	S pullorum	X, III	lv	1,4,6
	42	S londres		eh	1,4,6
	43	S anatum		eh	1,4,5
	44	S anatum, var. muenster		—	—

CAPITULO XXXI

BACTERIOFAGO

AISLAMIENTO

El bacteriófago puede aislarse de varias fuentes: de las deposiciones, del agua de alcantarillas o acequias, del pus de los procesos supurados (ántrax, osteomielitis, etc.). Para obtenerlo se mezcla estos productos con una pequeña cantidad de caldo Martin a pH 7,4 a 7,6 y se colocan a la estufa a 37 grados durante 24 horas. Se filtra por gasa, papel filtro y por bujías Chamberland L2 o L3 o por filtros Seitz. Este filtrado contiene el bacteriófago activo de escasa o mucha virulencia capaz de lisar diferentes especies microbianas. Para investigar su presencia en estos filtrados pueden hacerse pruebas en medios sólidos y líquidos.

1) *Medios sólidos.*— Se siembran en "nappe" tubos o placas de Petri de agar con cultivos frescos (18 a 20 horas) de un germen. Se coloca sobre esta siembra una o dos gotas del filtrado y se llevan los cultivos a la estufa a 37 grados. Se observan a las 6, 8, 10 ó más horas (según el germen utilizado). La presencia de bacteriófago se manifiesta por una zona sin cultivo, de bordes cortados como con saca - bocados. Puede también mezclarse el cultivo fresco con algunas gotas del filtrado y distenderse en "nappe" sobre el agar; en este caso las áreas transparentes se encuentran diseminadas en toda la superficie del cultivo.

2) *Medios líquidos.*— Para investigar la presencia del bacteriófago en los filtrados originales se utiliza una serie de 3 ó más tubos con 11 c.c. (300 gotas) de caldo Martin a pH 7,4 ó 7,6. En

el primer tubo se coloca 20 gotas del filtrado, en el segundo tubo, 3 gotas y el tercero se deja como control (sin filtrado). Se siembran todos los tubos con una o dos gotas de cultivo fresco del germen, se agitan para mezclar íntimamente y se llevan a la estufa a 37 grados durante cuatro o seis horas. Al revisarlos se pueden encontrar:

a) Que los tres tubos estén igualmente turbios, lo que significa que no existe un bacteriófago activo para el germen o que el bacteriófago presente en el filtrado es de muy escasa actividad; en este último caso puede exaltarse filtrando el contenido del primer tubo de la serie y repitiendo las experiencias en la misma forma descrita hasta 6 u 8 veces.

b) Que el primer tubo con 20 gotas del filtrado aparezca transparente y los otros dos turbios; esto significa que existe en el filtrado un bacteriófago suficientemente activo para producir la lisis microbiana cuando se usa a escasas disoluciones.

c) Que el primero y segundo tubo presenten aspecto transparente lo que significa que el bacteriófago en estudio es capaz de producir la lisis en disoluciones al 1 x 100. En todos los casos puede exaltarse la virulencia del bacteriófago filtrando el contenido del primer tubo de la serie y repitiendo varias veces la experiencia en la forma ya indicada.

TITULACIÓN DEL BACTERIOFAGO

Se puede hacer por diluciones en medios líquidos y por recuento de las áreas líticas en medios sólidos.

1) *Por diluciones en medios líquidos.*— Tomar una serie de tubos (6 a 8) con 11 c.c. (300 gotas) de caldo Martin a pH 7,4 ó 7,6: colocar en el primer tubo 3 gotas del bacteriófago a titular, mezclar y pasar 3 gotas al segundo tubo, mezclar nuevamente y pasar 3 gotas al tercer tubo y así sucesivamente hasta el penúltimo tubo haciendo por consiguiente cada vez diluciones 100 veces mayores; el último tubo se deja de control. Agregar a cada tubo una o dos gotas del cultivo fresco del germen sensible; mezclar íntimamente y llevar a la estufa a 37 grados durante 4 a 6 horas. Suponiendo que hasta en el quinto tubo aparezca lisis total (caldo transparente), el bacteriófago en estudio es activo hasta en diluciones al 1 x 10.000.000.000 (10 - 10) ya que las diluciones fueron 100 veces mayores en cada tubo.

2) *Titulación por recuento de áreas líticas.*— Sirve para conocer el número de corpúsculos de bacteriófago. Se necesita conocer la dilución máxima que es capaz de producir la lisis total en medios líquidos. Se toma un c.c. de esta dilución recientemente preparada en emulsión microbiana fresca y se reparte en 10 placas de

Petri de agar (0,1 c.c. por cada placa). Se distiende y se lleva a la estufa a 37 grados durante 4 ó 6 horas. Seguramente se obtienen áreas líticas aisladas; se cuentan estas áreas, se suman y el total de las 10 placas se multiplica por la dilución primitiva del bacteriófago para obtener la cantidad total de áreas líticas que contiene 1 c.c. del bacteriófago original.

Ejemplo: Sea la dilución máxima que produce la lisis total igual $1 \times 1.000.000$. Se toma 1 c.c. de esta dilución recientemente preparada de un cultivo fresco del germen. Se siembra en 10 placas de Petri de agar. Se lleva a la estufa. A las seis horas se hace el recuento de las áreas líticas y se obtiene:

Primera placa	igual	9	áreas líticas
Segunda "	"	4	" "
Tercera "	"	8	" "
Cuarta "	"	6	" "
Quinta "	"	10	" "
Sexta "	"	3	" "
Séptima "	"	4	" "
Octava "	"	5	" "
Novena "	"	2	" "
Décima "	"	5	" "
Total			56 áreas líticas
		$56 \times 1.000.000 = 56.000.000$	

Resultado: El bacteriófago original contiene 56.000.000 de corpúsculos por c.c. $56 \times 1.000.000$ igual 56.000.000.

CAPITULO XXXII

BRUCELLOSIS

GENERALIDADES

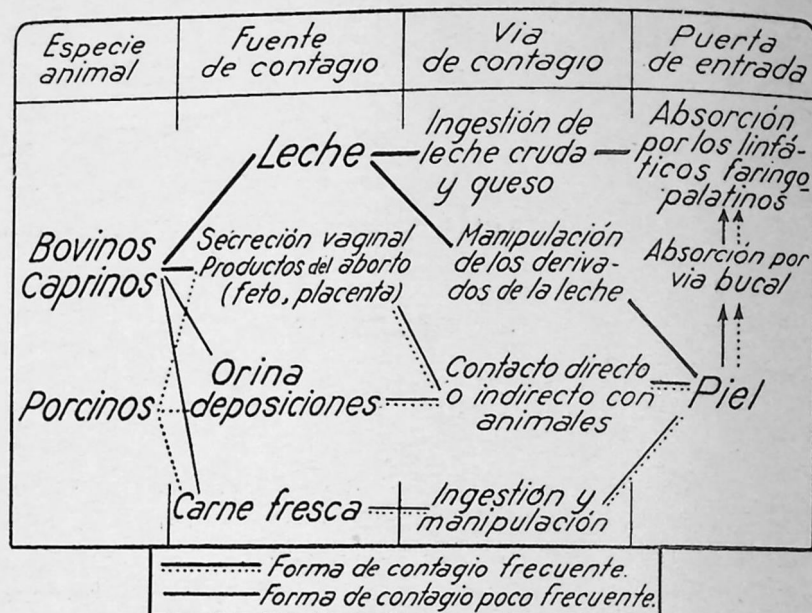
El género "Brucella" comprende diversos tipos que son los agentes etiológicos de la "Fiebre ondulante o Fiebre de Malta" en el hombre y del "Aborto epizoótico" en los animales.

Tres son las formas fundamentales de Brucellas: la **Br. melitensis**, la **Br. abortus** y la **Br. suis**. Estos tres tipos son patógenos para el hombre y pueden provocar la fiebre ondulante, pero la **Br. melitensis** tiene un grado mayor de capacidad infecciosa. Para los animales existe una adaptación específica marcada, que es el criterio que impone la diferenciación de las tres formas. La **Br. melitensis** infecta a los caprinos y ovinos; la **Br. abortus** o Bacilo de Bang, los bovinos y la **Br. suis**, los porcinos.

CARACTERES COMUNES

Son gérmenes pequeñísimos de forma de coccus o bacilos muy cortos, (0,4 a 0,7 micrones), inmóviles, dotados de vivos movimientos brownianos, sin cilios, ni esporas, Gram negativos. Se cultivan en los medios ordinarios, pero son de desarrollo lento recién aislados del organismo; anaerobios facultativos; no coagulan la leche, ni fermentan los azúcares, ni forman indol. No licúan la gelatina. Son igualmente aglutinados por el suero específico.

TRANSMISIÓN DE LA INFECCIÓN BRUCELLAR AL HOMBRE



INOCULACIÓN EXPERIMENTAL

El cuy puede infectarse fácilmente por vía subcutánea, por ingestión y aun por escarificación. La infección determina siempre una reacción linfática y ganglionar que se generaliza; el bazo se hipertrofia. La enfermedad es de larga duración, crónica y evoluciona sin fiebre típica. En el bazo, médula ósea y ganglios se forman "nidos microbianos".

CARACTERES DIFERENCIALES

Las distintas formas de Brucellas tienen escasas diferencias que es posible ponerlas en evidencia por las **pruebas bacteriostáticas de Huddleson** y la producción de hidrógeno sulfurado. Para tales pruebas se recomienda el **medio de Staffseth** (agar-hígado a pH. 6,6) adicionado de los colorantes que se indican en el cuadro adjunto:

ESPECIE	MEDIOS BACTERIOSTÁTICOS DE HUDDLESON				Hidrógeno sulfurado Días de reproducción			
	Fucsina básica 1 X 25.000	Tionina 1 X 30.000	Pironina 1 X 100.000 1 X 200.000		1	2	3	4
Abortus	+	-	++	++	++	++	-	-
Melitensis	+	+	+	++	+	-	-	-
Suis	-	+	-	-	++	++	++	++

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Indicaciones. — Se debe pensar en una Brucellosis cuando se está frente a una infección de carácter tifoideo de curso anormal; en presencia de una infección generalizada a recaídas o más bien a tipo febril ondulante, como igualmente ante una fiebre intermitente o estados febriles prolongados que recuerdan la tuberculosis (fiebre, astenia, sudoración abundante, enflaquecimiento, etc.). Igualmente en aquellos individuos que han ingerido leche o quesos de cabra y proceden de una región contaminada.

Métodos directos.

Tienen por objeto aislar las Brucellas del organismo enfermo.

Hemocultivo. — Es el criterio más seguro en cuanto al diagnóstico bacteriológico. Sólo es posible obtener resultados positivos cuando el enfermo tiene temperaturas superiores a 38°. Se puede emplear la técnica corriente, o bien la siembra directa de la sangre no coagulada en tubos con medios mejorados. Dado que las Brucellas tienen desarrollo lento recién aisladas, no debe considerarse negativo ningún hemocultivo sino después de una observación prolongada (8 a 15 días). Se recomienda, para favorecer el desarrollo del B. de Bang, colocar parte del material sembrado en una atmósfera de anhídrido carbónico al 10%. En los tubos con medios sólidos las primeras colonias aparecen al fondo a contacto con la sangre. Son de forma redonda, de bordes regulares y continuos, solevantadas, homogéneas y cremosas.

Inoculación. — No constituye un método recomendable, porque el diagnóstico es muy tardío, significa un peligro constante de infección para el personal de laboratorio y obliga en todo caso a recurrir al sero-diagnóstico y a los cultivos para la identificación microbiana.

Uro y Copro - cultivo. — Son métodos de laboratorio de técnica dificultosa y, por consiguiente, sin aplicación práctica.

Métodos indirectos.

Tienen por objeto poner en evidencia los distintos anticuerpos (aglutininas, sensibilizatriz), como asimismo el estado alérgico del organismo enfermo.

Aglutinación.—Reacción de Wright. — Se procede en la forma indicada en la sero-reacción de Widal. El "título mínimo" para la interpretación diagnóstica es de 1 x 400. Sin embargo, es frecuente obtener títulos altos (1 x 1000 a 1 x 3600), lo que es una característica de la enfermedad en evolución. Es recomendable hacer distintos títulos para despistar el "fenómeno paradójal" que es frecuente en la reacción de Wright.

Fijación del complemento. — La investigación de la sensibilizatriz constituye una reacción estrictamente específica, muy sensible y de fácil realización.

Intradermo-reacción a la "melitina". — Es una reacción de carácter alérgico. Se emplea como antígeno, en esta reacción, llamada también de Burnet, un cultivo en caldo-placenta de 20 días y filtrado. La reacción (1/10 de c.c. de melitina o abortina) es positiva en los enfermos ya al cabo de 6 u 8 horas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS.—La sospecha clínica, imposible de confirmar absolutamente sin el recurso del laboratorio, se hace innegable con el aislamiento del germen del enfermo (hemocultivo, uro- y copro-cultivo, inoculación, etc.). Cuando una temperatura inferior de 38° (período apirético de la curva ondulante), impide tales métodos, se recurre a los procedimientos indirectos de diagnóstico. La Reacción de Wright con título alto es de gran presunción diagnóstica. La simultaneidad de reacciones (Wright, Burnet y fijación del complemento), positivas confirman el diagnóstico.

CAPITULO XXXIII

TUBERCULOSIS

BACILO DE KOCH

GENERALIDADES

El B. de Koch es el agente específico de la tuberculosis del hombre y de los animales. Se conocen actualmente cuatro tipos de B. tuberculosos: **B. humano**, **B. bovino**, **B. aviario** y **B. pisciario**, semejantes entre sí por sus caracteres fundamentales, pero que difieren por ciertas particularidades biológicas.

MORFOLOGÍA

El B. tuberculoso se presenta como un bastoncito de ancho uniforme (0,3 micr.) y de longitud variable (1,5 a 4 micr.), derecho o ligeramente incurvado. Es, generalmente, inmóvil, pero en los cultivos homogéneos o bien en los cultivos muy jóvenes es ligeramente móvil gracias a la presencia de cilios. La formación de esporas ha sido discutida, pero actualmente se tiende a considerarlo como no esporulado, dada su poca resistencia a los agentes de destrucción (basta 75° durante 10 minutos para esterilizar los cultivos en medio líquido o las emulsiones del bacilo).

Esta forma clásica del bacilo no parece representar sino un aspecto de un ciclo evolutivo complejo. De las formas alargadas, flexuosas y a veces ramificadas que recuerdan el aspecto de un micelio, se puede llegar a los corpúsculos gramófilos y también a las formas no ácido-resistentes. En trabajos recientes se ha señalado las formas filtrantes, presentes en los productos patológicos y en los cultivos y capaces de generar nuevamente la forma adulta como también de provocar por inoculación a los cuyes lesiones variables: forma nodular, forma caquetizante sin lesiones macroscópicas o bien la forma larvada efímera sólo revelable por la intradermo-reacción a la tuberculina.

Coloración. — El B. de Koch se colorea difícilmente por los colorantes básicos de la anilina, pero una vez que ha sido coloreado retiene enérgicamente la substancia colorante aun sometido a la acción de decolorantes poderosos, tales como el alcohol absoluto y los ácidos minerales diluïdos. De ahí, entonces, que el B. de la tuberculosis sea **alcohol y ácido resistente**. Estos caracteres tintoriales los comparte con un escaso número de gérmenes patógenos (B. de la lepra humana y B. de la lepra de las ratas) y saprófitos (B. de la mantequilla). No es raro, además, encontrar en el hombre otros bacilos ácido-resistentes, pero que difieren fundamentalmente del grupo anterior, porque no son alcohol-resistentes, (Bacilo del esmegma, del serumen, etc.).

El B. de Koch es susceptible de colorearse por el método de Gram, pero esta coloración es muy difícil y exige un contacto prolongado con la solución colorante. De ahí que se recurra a procedimientos especiales de tinción entre los cuales el más recomendado es el **método de Ziehl-Neelsen**.

PROCEDIMIENTO DE ZIEHL-NEELEN.

- 1) Colorear con fucsina de Ziehl concentrada durante 2 ó 3 minutos. Calentar ligeramente hasta la producción de vapores pero evitando llegar a la ebullición.
- 2) Lavar la lámina con agua fría para quitar el exceso de colorante.
- 3) Decolorar con una solución de ácido nítrico al tercio o de ácido sulfúrico al cuarto durante medio minuto. Lavar.
- 4) Terminar la decoloración con alcohol absoluto. Lavar.
- 5) Tinción de fondo con azul de Loeffler o con ácido pícrico diluido.

Los bacilos tuberculosos coloreados en rojo se distinguen ne-

tamente del fondo azul de la preparación. No siempre se presentan homogéneos. A veces tienen granulaciones separadas por espacios claros que le dan el aspecto de una cadena de cocos, (**granulaciones cromófilas**). En los cultivos envejecidos se encuentran formas voluminosas, ramificadas, terminadas a menudo por un engrosamiento en masa, que ha permitido considerar al B. de Koch como un hongo.

CARACTERES DE LOS CULTIVOS

Es un germen aerobio. Su *mínimum térmico* es de 30°. El *óptimum térmico* es de 38° para el B. tuberculoso de los mamíferos, y de 40° para el bacilo tipo aviario (adaptación a la temperatura de las aves). El bacilo de Koch se cultiva sobre un número limitado de medios especiales: medios a base de suero (Koch), de glicerina (Nocard y Roux), de yema de huevo (Dorset), etc. Su cultivo es lento (2 ó 3 semanas) y difícil, sobre todo en las primeras generaciones. Para obtener un cultivo inicial no conviene utilizar desgarro ni pus, pues los gérmenes de asociación al desarrollarse rápidamente impiden la multiplicación del B. de Koch, sino trozos de órganos tuberculosos, extraídos asépticamente y molidos en un mortero con arena estéril.

Suero glicerinado. — Se utiliza el suero de buey glicerinado al 4 por ciento y solidificado a 72°. El cultivo se hace visible a los 12 ó 15 días en forma de pequeñas colonias blancas, redondeadas, mamelonadas y de aspecto seco. El suero glicerinado es preferible para la obtención del cultivo inicial.

Agar glicerinado. — El cultivo aparece a las 2 ó 3 semanas. Las colonias son más numerosas, más voluminosas, rápidamente confluentes formando una membrana espesa, blanquecina, seca y mamelonada.

Medios a base de huevo. — Son muy favorables al desarrollo del B. tuberculoso. Se puede emplear el huevo solo (mezcla de clara y yema coagulada) adicionado de agua (**Medio de Dorset, Medio de Besredka**, etc.). También se emplean adicionados a otros medios: **Medio de Petroff, Medio de Petragnani, Medio de Loewestein**, etc.

Papa glicerizada. — Es un buen medio para obtener abundante cultivo y para la conservación del bacilo. Los cultivos son visibles desde el 10º día y a las 3 ó 4 semanas toman el aspecto de una masa saliente, mamelonada, granulosa, de color blanco - amarillento. En el líquido que existe en el fondo del tubo se forma un velo más o menos espeso con pliegues, útil para los traspasos a medios líquidos.

Caldo glicerizado. — El cultivo aparece a los 15 ó 20 días, formando un velo, al principio tenue, que recubre toda la superficie del caldo, para hacerse espeso, plegado y dejando el líquido completamente transparente.

Medios sintéticos. — El más conocido es el **Medio de Sauton**, que contiene asparagina, glicerina, ácido cítrico, fosfato bipotásico, sulfato de magnesio, citrato de fierro y agua destilada.

PRODUCTOS TÓXICOS

Los B. tuberculosos encierran sustancias tóxicas que son puestas en libertad mediante la maceración prolongada o la desagregación de los elementos microbianos por procedimientos mecánicos o químicos. Estas sustancias tóxicas están ligadas íntimamente al protoplasma microbiano.

Toxicidad de los bacilos muertos.— Los cultivos muertos por el calor a los 115º e inyectados subcutáneamente suelen producir un absceso local sin reacción ganglionar. La inyección endovenosa en conejos provoca la producción de un granuloma a nivel de los pulmones. La inyección peritoneal va seguida de un granuloma peritoneal.

Endotoxina. — Se ha estudiado la acción de las endoproteínas y de los lípidos, sin confirmarse plenamente la presencia de verdaderas endotoxinas en los bacilos de Koch.

Tuberculinas. — Se da el nombre genérico de tuberculinas a toda una serie de productos que representan extractos de cultivos de B. tuberculosos y la mayoría de los cuales poseen idénticas propiedades. El más estudiado es la "tuberculina antigua de Koch".

Preparación. — Esterilizar por calentamiento a 100º durante media hora cultivos de 5 a 6 semanas en caldo glicerizado al 4 por ciento. Después concentrar al baño María hasta reducirlo a la décima parte del volumen primitivo. Se filtra para separar los cuerpos microbianos. El filtrado constituye la tuberculina bruta. Es un líquido de color oscuro, siruposo, límpido, de olor agradable, y cuyo principio activo es muy resistente al calor.

Las tuberculinas se emplean corrientemente en clínica para poner en evidencia el estado alérgico que se determina en el organismo como respuesta a la penetración del bacilo de Koch. De ello se desprende que todo individuo que albergue en su organismo el bacilo de Koch reaccionará frente a la inyección de tuberculina, dando lugar a manifestaciones de carácter diverso según cual sea la vía empleada. *En el adulto, por lo tanto, las reacciones de tuberculina sólo indican presencia de bacilo de Koch, no revelan enfermedad.* No es posible, por lo tanto, utilizarla en el diagnóstico de la tuberculosis. En los niños hasta la edad de uno a dos años tiene gran valor, pues la positividad de la reacción permite afirmar la presencia de focos de tuberculosis en evolución, ya que en ellos rara vez se hallan focos tópicos.

Los estados de alergia determinan la desaparición de las reacciones de tuberculina; de ahí, entonces, que en los tuberculosos en caquexia las pruebas sean negativas.

TECNICA DE LA REACCION.

Pueden emplearse las tres vías siguientes:

- 1) *La cutánea o dérmica.*
- 2) *La transcutánea o intradérmica.*
- 3) *La conjuntival.*

Reacción cutánea de Von Pirquet. — Previa desinfección de la piel del brazo, en su cara anterior externa, se practican con una lanceta, dos escarificaciones paralelas separadas entre sí por espacios de dos centímetros. Deben afectar sólo la epidermis, evitando, por lo tanto, la salida de sangre. En una de estas escarificaciones se deposita una gota de tuberculina diluida al cuarto en glicerina estéril. En la otra se agrega glicerina que sirve de control.

La reacción se considera positiva si a las 24 ó 48 horas aparece una pápula edematosa, de límites regulares o festoneados, de tinte

rojo, que se acentúa y llega a veces a ser violáceo. Su diámetro varía de cuatro a cinco milímetros, llegando en las reacciones fuertes hasta 2 cms. El signo característico es la induración que la pápula presenta al tacto: Cuando se la comprime con los dedos, da la sensación muy neta de una resistencia elástica.

Al cabo de cuatro días la pápula se borra y es reemplazada por una fina costra que cae sin dejar cicatriz.

TUBERCULINA DERMICA.

En Pediatría se suele emplear, siguiendo los procedimientos de Moro y Loewenstein, una pomada que contiene las sustancias solubles del bacilo de Koch y los cuerpos bacilares muertos por calentamiento. Se recomienda especialmente para el diagnóstico de las afecciones bacilares del niño.

Técnica. — Después de limpiar con éter, alcohol, la piel del brazo, espalda o del pecho, se deposita con ayuda de una pequeña varilla de vidrio una porción del preparado y se frota durante 1 a 2 minutos. La reacción positiva se manifiesta por la formación de verdaderos nódulos o botones que aparecen al cabo de 24 a 72 horas, según el grado de sensibilidad cutánea. En las afecciones escrofulosas, por ejemplo, estos nódulos se desarrollan en gran cantidad.

Reacción intradérmica de Mantoux. — Se emplea tuberculina diluida en suero fisiológico al 1 x 5000. Se hace la inyección de 0,1 c.c. de la dilución en el espesor del dermis del antebrazo. Cuando va a ser positiva, la reacción se manifiesta al cabo de algunas horas alcanzando su máximo de intensidad al segundo día. Consiste en una infiltración eritematosa con un nódulo central de color rojo vivo y rodeada de una zona eritematosa. La infiltración central que puede tener de uno a tres cms. de diámetro da, al palparla, la sensación de un espesamiento del dermis.

En regla general la reacción empieza a regresar después de las 48 horas; el halo desaparece rápidamente pero el nódulo central persiste algunos días.

En algunos casos, muy raros, la reacción aparece tardíamente, del 3º al 5º día.

Si con la dilución al 1 x 5000 los resultados son negativos, se recomienda practicar una verdadera escala de reacciones con diluciones que van del 1 x 5000 al 1 x 1000. De esta manera se pueden sacar conclusiones exactas respecto al grado de sensibilidad del individuo para la tuberculina, que, como se comprende, es muy variable de un sujeto a otro.

Oftalmo - reacción de Calmette. — Instilada en la conjuntiva, la tuberculina diluida al 1 x 100 determina en los portadores de bacilos una congestión más o menos intensa. En los tuberculosos ha provocado, en ocasiones, accidentes oculares serios, por lo cual, a pesar de tratarse de un método bastante demostrativo, se ha abandonado como técnica en medicina humana y se la emplea especialmente en veterinaria.

ACCIÓN PATÓGENA EXPERIMENTAL

Cuy. — El cuy es el reactivo por excelencia del bacilo tuberculoso tipo humano. Todo cuy inoculado con bacilo humano o con productos patológicos que contengan aún en pequeña cantidad estos gérmenes, contrae la tuberculosis y muere. La inoculación de animales nuevos **primo - inoculación**, difiere en su evolución de la de los animales sometidos a una sobreinfección.

La primo-inoculación por vía subcutánea produce al cabo de 8 a 10 días una tumefacción en los ganglios correspondientes; el animal comienza a enflaquecer hacia la tercera o cuarta semana, se caquectiza, tiene temperatura y muere al cabo de 2 a 4 meses. A veces se forma en el punto de inoculación un nódulo indurado, que se ulcera (chancre tuberculoso) y que persiste hasta la muerte del animal.

A la autopsia se encuentran lesiones tuberculosas generalizadas: el bazo es voluminoso, oscuro, sembrado de tubérculos caseosos o de granulaciones amarillentas más recientes; el hígado presenta lesiones análogas pero menos marcadas; las serosas y la superficie de los pulmones y de los riñones, aparecen con tubérculos blancos y grises. Los ganglios linfáticos vecinos al punto de inoculación están reblandecidos y caseosos.

En todas las lesiones se encuentra en abundancia el bacilo de Koch.

La descripción anterior corresponde a la tuberculosis experimental **tipo Villemin**.

Si el animal es sacrificado después de un mes es posible encontrar sólo lesiones ganglionares y "granulaciones" en el bazo e hígado.

La primo - inoculación transcutánea (piel rasurada) produce idénticas lesiones que la subcutánea pero de evolución más lenta.

Unas gotas de cultivo depositadas sobre el globo ocular *inoculación conjuntival*, determina la aparición de una tuberculosis ganglionar típica, al principio local (ganglio retromastoideo), y después generalizada.

La *inoculación intra - peritoneal* provoca la muerte muy rápidamente (2 a 4 semanas) con el peritoneo infiltrado de tubérculos y formando masas caseosas. En el macho hay a menudo una vaginitis.

La *inoculación intra - mamaria* efectuada en cuyes hembras en lactación produce una infección rápida, con bacilos en la leche desde el 8º al 15º día y con tumefacción precoz de los ganglios supra y retro - mamarios.

La infección experimental por *inhalación* hace sucumbir a los animales con lesiones pronunciadas de bronco - neumonia caseosa.

La *ingestión* de B. de Koch en los animales muy receptivos produce lesiones localizadas a los ganglios tráqueo - bronquicos y pulmón.

Conejo. — Es poco sensible a la inoculación del B. de Koch tipo humano. En cambio es más sensible al B. bovino y especialmente al B. aviario. Se utiliza el conejo para el diagnóstico diferencial del B. humano y bovino. El B. humano en la inoculación subcutánea no determina sino un absceso local y el animal no sucumbe. Sacrificado, no se encuentran lesiones o solamente raras granulaciones en los pulmones y riñones. Con el B. bovino el animal sucumbe en uno o varios meses con tubérculos o masas caseosas en los pulmones o en los riñones, más raramente en los otros órganos. El B. aviario inoculado por vía intravenosa produce la muerte del conejo en 2 ó 3 semanas, sin lesiones aparentes, pero con la presencia de abundantes bacilos en todos los órganos. Esta es la tuberculosis **tipo Yersin**. El tipo Yersin es posible producirlo también con inoculación de fuertes dosis de bacilos de los mamíferos.

Aves. — Constituyen el reactivo tuberculoso para el tipo aviario. Son poco sensibles al bacilo de los mamíferos.

Cuando un animal ya infectado es sometido a una nueva inoculación de bacilos tuberculosos, esta **sobreinfección** tiene una evolución muy distinta a la de la primo - inoculación.

Si a las 4 ó 6 semanas después se reinocula un cuy, la región inoculada se endurece desde el segundo día, toma un tinte oscuro, la piel se necrosa y finalmente se elimina la escara dejando una ulceración que cicatriza rápidamente sin que aparezca la adenitis correspondiente. Este es el fenómeno de Koch que, comparado a la primo-inoculación, se diferencia por su rapidez de aparición, su naturaleza necrótica y la ausencia de la infección ganglionar.

CAPITULO XXXIV

DIAGNOSTICO BACTERIOLOGICO DE LA TUBERCULOSIS

El diagnóstico bacteriológico de la infección tuberculosa puede establecerse por *métodos directos* y por *métodos indirectos*.

Los *métodos directos* tratan de poner en evidencia la presencia del bacilo por examen directo (coloración), por los cultivos o por la inoculación experimental. Estos métodos son aplicables siempre que se trate de lesiones tuberculosas abiertas o, por lo menos, accesibles a los medios de investigación.

Los *métodos indirectos* están basados ya sea en la acción especial de la tuberculina, ya sea en la investigación de los anticuerpos específicos (aglutininas, sensibilizatriz, precipitinas), en los humores del enfermo. Sólo los métodos directos dan certidumbre; es más discutido el valor de los métodos indirectos.

MÉTODOS DIRECTOS

Consideraremos sucesivamente los productos patológicos que más frecuentemente son objeto de investigación.

DESGARRO.

a) *Coloración*. — Para el examen microscópico del desgarro es recomendable sacar con el asa de platino la porción de aspecto más sólido y purulento y extenderla en un porta-objetos con cuidado y en capa delgada. Se procede en seguida a la tinción de este frotis con el procedimiento de Ziehl - Neelsen, indicado anteriormente.

Concentración con homogeneización previa.— Cuando el examen directo sobre lámina con coloración Ziehl - Neelsen es negativo, hay que recordar que los bacilos expectorados pueden ser tan raros que sólo una observación microscópica prolongada durante horas podría descubrirlos. Debe recurrirse en tales casos a los métodos de concentración que permiten reunir en una misma lámina la totalidad de los bacilos diseminados en 10 c.c. de desgarro. La "homogeneización" se propone disolver todos los elementos del desgarro, salvo los bacilos tuberculosos que son muy resistentes. De los muchos procedimientos descritos el más práctico es el "método de Bezangon y Philibert":

1) Medir una cantidad dada de desgarro (p. e.: 2 c.c.). Agregar una cantidad de agua destilada 10 veces superior. (20 c.c.) y 1 gota de soda por c.c. de desgarro (2 gotas).

2) Calentar en una cápsula de porcelana lentamente hasta la ebullición durante 10 minutos, hasta obtener una emulsión límpida y homogénea.

3) Dejar enfriar y agregar alcohol de 50° (5 c.c. por cada 2 c.c. de desgarro). Se obtiene así una disminución de la densidad, útil en la centrifugación.

4) Centrifugar $\frac{1}{2}$ hora. Extender en láminas y colorear por el método de Ziehl - Neelsen.

Procedimiento de la antiformina.— Se mezcla en un matraz 20 a 30 c.c. de desgarro, de pus o de deposición, con igual cantidad de una dilución de antiformina al 15 p. 100 en agua destilada. Agitar fuertemente por algunos minutos y dejar actuar durante 2 a 5 horas. Repartir en varios tubos de centrifuga estériles y centrifugar durante diez minutos. Proceder a la coloración por el método de Ziehl - Neelsen.

b) *Cultivos*. — Los cultivos de Bacilo de Koch a partir del desgarro se dificultan por la concurrencia de la flora de asociación. De ahí que se recomiende destruir dicha flora, tratando previamente el desgarro con ácido sulfúrico al 1/5 durante 1/4 de hora, método basado en la ácido-resistencia del germen que nos ocupa. En seguida

se neutraliza la acidez con soda o caldo peptonado. El desgarro así tratado se siembra en los diferentes medios especiales de cultivo.

c) *Inoculación.* — Es indispensable tratar el desgarro con ácido sulfúrico, como lo hemos indicado más arriba, a fin de evitar las lesiones locales o generales de la flora de asociación que van a matar el animal al cabo de pocos días y, por lo tanto van a impedir la acción del bacilo de Koch.

La inoculación puede hacerse por las vías que hemos indicado en el capítulo respectivo.

Cuando el desgarro es rico en bacilos, el cual muere a las 8 ó 10 semanas, precedido de un enflaquecimiento manifiesto. A la autopsia se observan las lesiones características. Si hay urgencia en establecer el diagnóstico se puede, a los 15 días, extraer el ganglio inguinal, molerlo en un mortero estéril, someterlo al método de homogeneización, centrifugar el líquido y buscar los bacilos en el centrifugado. Pero si el desgarro no contiene sino escasos bacilos, puede no producirse la adenitis inguinal y el cual conservar durante semanas y aun meses apariencia de salud. Sin embargo, a la autopsia, sacrificado el animal a los 3 ó 4 meses, es posible hallar tubérculos en el bazo y en el hígado.

Para afirmar la tuberculosis por este procedimiento, es preciso: 1º) comprobar la existencia de lesiones tuberculosas en el animal inoculado con el producto sospechoso y 2º) asegurarse, (coloración), que las lesiones halladas a la autopsia contienen el bacilo de Koch. Esta doble prueba permite eliminar los bacilos para-tuberculosos, que son generalmente poco patógenos y la pseudo-tuberculosis espontánea del cual al no encontrar los bacilos ácido-resistentes.

ORINA.

Siendo la orina un medio muy fermentescible, se someterá al análisis tan pronto como sea posible después de la micción. Si es necesario esperar más de una hora, se la conservará en hielo.

a) *Coloración.* — Se procede a partir del centrifugado de orina y con las técnicas indicadas para el desgarro. Es indispensable, eso sí, insistir en la decoloración por el alcohol, debido a la presencia de los bacilos del esmegma que son sólo ácido-resistentes. En casos de

duda se recurrirá a la inoculación que es el método seguro de diagnóstico.

b) *Cultivos e inoculación.* — Se procederá como en la investigación del bacilo de Koch en el desgarro, tratando el centrifugado de orina con ácido sulfúrico.

Siendo el filtro renal impermeable para el bacilo de Koch, debemos concluir que la presencia de este germen en la orina revela una tuberculosis en el árbol urinario.

SANGRE (METODO DE LOEWENSTEIN).

Se usa más frecuentemente con la técnica de Loewenstein el medio de cultivo que lleva el nombre del autor, hecho a base de huevo, asparragina, glicerina, sales de potasio, magnesio y sodio. Se adicionan como colorantes el rojo de Congo y el verde de malaquita.

Técnica de la preparación del medio de Loewenstein.

Mono-fosfato potásico	1 gramo
Sulfato de magnesia	1 ..
Citrato de sodio	1 ..
Asparragina	3 ..
Glicerina	3 ..
Agua	1000 ..

A 150 c.c. de esta solución se agregan 6 gramos de fécula de papas y 12 gramos de glicerina neutra estéril. Se hace hervir durante 15 minutos agitando enérgicamente. Se mantiene 1 hora a 56° hasta la producción de dextrina. Se coloca el todo en un matraz con perlas de vidrio, se agregan 4 huevos y una yema y se agita fuertemente. Se vierten 5 c.c. de una solución de rojo de Congo o de verde de malaquita al 2%. Se filtra a través de gasa estéril y se esteriliza por tindalización.

Se trata, como se ve, de un medio muy rico en principios nutritivos.

TECNICA DEL HEMOCULTIVO.

La sangre extraída con todas las precauciones de asepsia debe someterse a una serie de manipulaciones que tienen por objeto destruir, en reacción ácida, la hemoglobina, que por su gran tendencia a combinarse con el oxígeno entorpece el desarrollo del bacilo de Koch.

Para ello se procede como sigue: Se extraen 10 c.c. de sangre en un tubo que contiene 3 c.c. de una solución de citrato de sodio al 10%. Se tratan con una solución de ácido acético al 5% o ácido sulfúrico al 5% durante 5 minutos en tubos anchos de centrífuga. Se centrifuga y el sedimento se lava tres veces con 10 c.c. de agua destilada estéril hasta eliminar el exceso de ácido. Una vez tratada así la sangre, se siembra en 4 ó 5 tubos del medio de Loewenstein y se dejan a 38° en posición horizontal durante un plazo que puede prolongarse a 4 ó 5 meses. Se recomienda el control periódico del medio, antes de la aparición de colonias, procediendo al raspado de la superficie (microcultivo) y a la investigación del bacilo de Koch por la coloración de Ziehl - Neelsen.

Valor del método de Loewenstein.

- 1) El hemocultivo practicado con muestras de sangre pertenecientes a tuberculosis aguda no da el porcentaje elevado de resultados positivos indicado por Loewenstein.
- 2) Para las tuberculosis crónicas los resultados positivos sólo alcanzan a un porcentaje de 1,2%.
- 3) Las muestras provenientes de enfermos de reumatismo poliarticular agudo, eritema nudoso, demencia precoz y tuberculosis oculares no han dado, en general, ningún resultado positivo.
- 4) Las divergencias entre los resultados de Loewenstein y los de los demás experimentadores no son debidos a falta de técnica de parte de estos últimos, ni menos aun a errores de diagnóstico en los enfermos, (Sáenz y Costil).
- 5) Es indudable que el medio de cultivo propuesto por Loewenstein se revela superior a todos los propuestos hasta el presente para el cultivo del bacilo de Koch, cualesquiera que sea su origen.

PUS.

Los procedimientos de investigación son similares a los descritos para los otros productos patológicos. En lo que se refiere a la coloración, dada la escasez de los gérmenes, es necesario recurrir a los procedimientos de homogeneización descritos en el capítulo de desgarro.

LIQUIDO CEFALO - RAQUIDEO.

Previa punción lumbar en las mejores condiciones de asepsia, se obtiene líquido céfalo - raquídeo que en la meningitis tuberculosa tiene corrientemente aspecto de agua de roca con reticulos fibrinosos en suspensión. Es indispensable centrifugarlo durante 1/4 de hora, a lo menos, en tubos de centrífuga cónicos y en este centrifugado proceder a la investigación.

Conviene conservar una parte del líquido centrifugado, para el análisis químico y citológico, que es complemento indispensable en la investigación de la t.b.c. meníngea.

a) *Coloración.* — Por el procedimiento de Ziehl - Neelsen investiguense la presencia de bacilos de Koch y estúdiense simultáneamente los elementos celulares (leucocitos) del frotis. A pesar de su extrema rareza, la escuela francesa insiste en que su presencia es constante y despistable por la coloración.

b) *Cultivos.* — Se siembra el centrifugado en los medios ya conocidos.

c) *Inoculación.* — La técnica de Widal indica inyectar en el peritoneo de un cuy 10 c.c. del c. r. Si el bacilo de Koch existe, el animal morirá al cabo de algunas semanas de una t.b.c. peritoneal, generalizada después, con las lesiones conocidas. Se comprende que en un proceso de evolución rápida como es la meningitis t.b.c., un lapso de tiempo tan prolongado hace que este procedimiento sea poco práctico. Puede recurrirse a la inoculación intramamaria en hembras en lactación, según la técnica de Nattan - Larrier y Griffon, que da resultados positivos al cabo de 8 a 10 días.

DEPOSICIONES.

En las enteritis tuberculosas, generalmente secundarias, se puede investigar la presencia del bacilo de Koch, siguiendo la técnica corriente (coloración, cultivo e inoculación).

LAVADO DEL ESTOMAGO.

En los lactantes que no saben desgarrar, se solicita a menudo el examen bacteriológico del líquido de lavado de estómago, con el

cual se procede siguiendo la misma técnica que hemos indicado para el desgarro.

EXUDADOS (PLEURAL, PERITONEAL, PERICARDIACO).

Seguir la técnica que hemos enunciado para los otros productos patológicos, recordando que es necesario la homogeneización.

MÉTODOS INDIRECTOS

En tuberculosis los métodos indirectos, como ser, la investigación de los anticuerpos son a menudo de resultados dudosos e inciertos, dado que las propiedades antígenas del bacilo de Koch son complejas e inconstantes. Por otra parte, se trata de un germen de desarrollo difícil y lento que da lugar a cultivos que es indispensable modificar para obtener buenos antígenos en la investigación de los distintos anticuerpos: así son necesarios **cultivos homogéneos** para la aglutinación, extractos bacilares diversos para la fijación del complemento, etc.

Estudiaremos los anticuerpos más corrientemente investigados en clínica, contemplándolos en especial en lo que se refiere a la interpretación de los resultados.

AGLUTINACION.

Ha sido especialmente estudiada por Arloing y Courmont. Es un requisito fundamental para las reacciones de aglutinación que el antígeno se utilice en suspensión homogénea. Se comprende que el suero - diagnóstico de la tuberculosis es imposible de practicar con los cultivos ordinarios compuestos de bacilos aglomerados en velo o costras, que tienen gran tendencia a la aglutinación inespecífica espontánea. Esta dificultad ha sido resuelta con los "cultivos homogéneos" que son buenos antígenos para la sero - reacción de aglutinación. En líneas generales dicho procedimiento consiste en sembrar una cepa reconocidamente aglutinable de bacilo de Koch en el medio de Courmont hecho a base de glicerina, peptona Dufresne y cloruro de sodio agitando diariamente el cultivo. Se emplean cultivos de un cierto número de días y la técnica es en todo semejante a la que hemos descrito para las reacciones de aglutinación en general.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS. — La suero-reacción tiene en tuberculosis un valor diagnóstico muy restringido.

1º El suero de los individuos sanos suele aglutinar en una proporción de un 26%, según Arloing. Es posible que estas reacciones positivas correspondan a la existencia de una tuberculosis latente: no indican, por consiguiente, si se trata de lesiones en evolución. Por lo tanto, la investigación de la aglutinación no tendría valor clínico sino cuando diera resultados negativos, lo que tampoco es constante.

2º El suero de los no tuberculosos (fiebre tifoidea, neumonía, fiebre puerperal, febricitantes, etc.), aglutina casi constantemente a los cultivos homogéneos.

3º En los tuberculosos la reacción suele ser negativa en las formas avanzadas y en ciertas formas agudas como en la granulosa. Por otra parte, es frecuentemente negativa en las formas incipientes y lo es constantemente en el lupus. Sin embargo, en las tuberculosis crónicas, lentamente evolutivas, Bezançon ha obtenido hasta un 83% de resultados positivos.

4º Las tuberculosis de las serosas dan, a partir del exudado, resultados en todo semejantes, en cuanto a tasa de aglutininas, a los que da el suero de los enfermos. Courmont ha hecho, a partir de este examen, el sero - pronóstico de la afección en el sentido que éste sería tanto más benigno cuanto mayor fuera el poder aglutinante del exudado.

PRECIPITACION.

El suero de los bovinos experimentalmente infectados, da origen a una reacción de floculación en presencia de tuberculina o extractos de bacilos tuberculosos. Se pensó utilizar este procedimiento para el diagnóstico de la tuberculosis humana, pero las investigaciones de los distintos autores concuerdan en que no se trata de una reacción específica. Es, generalmente, positiva con el suero de los individuos sanos o con el suero de enfermos de afecciones diversas y, frecuentemente, negativa en los tuberculosos. Es, por lo tanto, imposible utilizarla en la práctica para el diagnóstico de la tuberculosis.

FIJACION DEL COMPLEMENTO.

Reacción de Besredka. — La reacción de Bordet - Gengou

ha sido empleada en el diagnóstico de la tuberculosis. Las dificultades para su aplicación han estribado, como para todas las reacciones serológicas en tuberculosis, en la obtención de un buen antígeno. Parece establecido que ni la tuberculina, ni los cuerpos bacilares vivos o muertos constituyen antígenos de valor fijo. Ha sido necesario recurrir a antígenos previamente modificados. Entre ellos vale la pena citar el **antígeno de Besredka**, que es un filtrado de cultivo de bacilo de Koch en el medio del autor que es caldo - huevo. El **antígeno metílico de Nègre y Boquet** a base de un extracto acetónico tratado por alcohol metílico de un cultivo en caldo glicerinado de bacilo de Koch. Se puede emplear diluido al 10 ó 20%.

La técnica de la reacción corresponde en todo a la que hemos descrito en el capítulo de fijación del complemento.

VALOR DE LA REACCIÓN.—Puede aceptarse con Calmette que una reacción de fijación francamente positiva indica siempre una forma evolutiva de la enfermedad. Es, por otra parte, la más específica de las reacciones de diagnóstico de la tuberculosis. Sin embargo, la curva de la reacción es oscilante y, sin duda, en relación con la evolución de la tuberculosis. Es así, como la reacción es claramente positiva en pleno período de estado de la afección, y negativa, en cambio, en las formas incipientes y en las formas avanzadas.

CAPITULO XXXV

HONGOS PATOGENOS

GENERALIDADES

DEFINICIÓN. — *Con el nombre genérico de micosis se designa la infección del organismo determinada por hongos.*

Estas afecciones aparecen actualmente como más numerosas debido a la mayor facilidad de evidenciar la presencia de estos parásitos con las técnicas modernas. Frecuentemente las micosis se designan según el tejido u órgano atacados: **dermatomicosis**, **neumomicosis**, etc. A veces, recordando el género de parásito que la determinan: **actinomicosis**, **esporotricosis**, **mucormicosis**, etc., como también es posible que la designación de la afección micótica tenga por base el aspecto anátomo - patológico sin importar la especie parasitaria o los órganos atacados, como es el caso de los **micetomas**. No existe, por consiguiente, un criterio único en la clasificación médica de las micosis, ya que un grupo de ellas tiene por base el criterio clínico o anátomo - patológico y otras el aspecto parasitario.

Las micosis en general tienen tendencia a la cronicidad y a la difusión progresiva. La terapéutica beneficia corrientemente cuando se trata de combatir los **ectofitos**, o sea, los micetos localizados en la superficie de los tegumentos y directamente atacables. En cambio, los hongos que se desarrollan en el espesor de los tejidos (**endofitos**),

escapan a la acción medicamentosa que se hace insuficiente y exige la intervención quirúrgica radical. La cura yodada da, frecuentemente, resultados satisfactorios, como igualmente la aplicación de Rayos X.

CARACTERES MORFOLÓGICOS

Los hongos patógenos pueden presentar dos tipos vegetativos, entre los cuales se observa, a veces, tipos de transición:

a) *Tipo filamentoso*, constituido por entrecruzamiento de filamentos o **ifas** que forman un micelio de escasa tendencia a la disociación, y

b) *Tipo celular*, constituido por células redondas, ovales o alargadas capaces de yemación y designadas, por tal motivo, **blastocélulas**, las cuales tienen tendencia a separarse y formar elementos independientes.

Estos dos tipos fundamentales constituyen la subdivisión clásica de los hongos en **ifomicetos** y **blastomicetos**.

Los micetos filamentosos tienen el tallo vegetativo o **micelio**, con filamentos ramificados, ifas vegetativas, y a menudo una pared de celulosa que encierra el protoplasma rico en cromatina. A veces los filamentos o ifas son continuos formando el protoplasma una masa única como un sistema de tubos comunicantes (mucoríneas). Más frecuentemente las ifas presentan tabiques transversales que subdividen el micelio en segmentos o células alargadas y que, a veces, tienden a desarticularse.

REPRODUCCIÓN

El estudio de los órganos de reproducción de los hongos es interesante y ha permitido hacer clasificaciones:

1) *Reproducción asexual*. — Constituye la forma más simple de multiplicación y aparece según tres formas fundamentales: la **esquizogonia** o **cisión**, que puede ser simple o múltiple; la **blastogonia** o **yemación** y la **esporificación**, que puede hacerse por **endosporas**, **esporáneos**, **conídeas**, **clamidoporas**, **artrosporas** y por **actinoporas**.

2) *Reproducción sexual*. — Denominada también **fructificación**, que puede hacerse por **autogamia** o **anfimixis**, por **isogamia** (conjugación y copulación) y por **anisogamia** o **hetero-**

gamía que es la forma más evolucionada de la reproducción sexual, ya que hay formación de dos elementos sexuales: **microgameto** o **anterideo** y **macrogameto** u **oogonia** que uniéndose dan lugar a un elemento fecundado.

TÉCNICA GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y DIAGNÓSTICO

La técnica micológica está basada fundamentalmente en los métodos bacteriológicos de investigación y diagnóstico.

Indicaciones. — Se pensará, particularmente, en las micosis en presencia de una afección crónica, cutánea o visceral, de aspecto nodular o supurativo, rebelde a todo tratamiento y no asimilable a una causa microbiana conocida a pesar de los exámenes de laboratorio repetidos y convenientemente practicados.

Deberá orientarse los exámenes en la investigación de hongos en los casos de lesiones profundas, que evolucionan sin fiebre y que por los exámenes clínicos y de laboratorio se apartan del cáncer, la tuberculosis y la sífilis. Es de especial interés el diagnóstico diferencial precoz, ya que el pronóstico y la terapéutica a seguir dependen fundamentalmente de la seguridad diagnóstica. Todos los gomas o tumores, fistulizados o no, con supuración crónica tórpida y tenaz, harán pensar en infestaciones micósicas.

En las infecciones subagudas o crónicas de las mucosas (estomatitis cremosas) y de la piel (micosis superficiales o dermatomycosis) la investigación bacteriológica orientada hacia la presencia de hongos, se impone al criterio del clínico.

TECNICA MICOLOGICA.

En presencia de las indicaciones citadas anteriormente, es posible la intervención del laboratorio mediante:

- 1) *El examen directo.*
- 2) *El cultivo y su aspecto.*
- 3) *Las reacciones biológicas.*
- 4) *La inoculación experimental.*
- 5) *Los cortes histológicos.*

1.—Para practicar el *examen directo* se recoge el pus o el producto de escarificación de la pared de las lesiones sobre una lámina y se procede al examen a fresco o previa coloración.

a) Para facilitar el *examen a fresco* se recomienda disociar el material en una gota de ácido acético al 10% o en la glicerina y examinar al microscopio entre lámina y laminilla. El líquido que más frecuentemente se utiliza es el lacto-fenol de Amann (ácido fénico crist. puro, 1 gramo. Ácido láctico, 1 gr. Glicerina, 2 grs. Agua destilada, 1 gr.).

b) El *examen previa coloración* sigue en líneas generales los métodos de fijación usados en bacteriología (alcohol absoluto o alcohol metílico) y las técnicas de coloración directa con colorantes de anilina, la coloración de Gram doble, de Ziehl-Neelsen, coloraciones vitales, etc.

Cuando el resultado del examen directo es negativo no debe eliminarse definitivamente la posibilidad de infección micótica, ya que ciertos hongos no se les descubre sino por los cultivos o reacciones biológicas.

2.—En ciertos casos el *cultivo* es necesario, sea que el examen directo así lo exige (esporo-tricosis, ooidium, etc.), o bien sea indispensable precisar el tipo parasitario (actinomicosis, aspergilosis, tiñas, etc.).

Contrariamente a los bacterios propiamente tales, los hongos prefieren una ligera reacción ácida de los medios de cultivo. Los medios más frecuentemente usados son: el Agar de Sabouraud, los medios de levadura, la papa simple o glicerinada, la zanahoria, las infusiones vegetales, los medios sintéticos, etc.

Generalmente los hongos son aerobios y requieren amplias superficies (matraces, placas de Petri). Se desarrollan corrientemente a temperatura ordinaria, 20 a 25 grados, con excepción de algunos hongos patógenos de lesiones profundas que exigen la temperatura del cuerpo humano para la buena multiplicación. El desarrollo es generalmente lento, de 5 a 25 días y la observación macroscópica de los cultivos es de gran importancia en micología (aspecto, pigmento, tamaño, adherencia, consistencia, bordes, etc.). El estudio de las reacciones bioquímicas, tan importante en bacteriología, tiene escaso valor en el estudio de los micetos.

3.—Las *reacciones biológicas o inmunitarias* son utilizadas en micología sin tener aún la importancia diagnóstica que le corresponde a los esquizomicetos. Se utiliza el **serodiagnóstico** mediante la aglutinación en las esporotricosis y en otras micosis, como igualmente algunas **reacciones alérgicas e inmunitarias**. El valor de es-

tas reacciones es limitado, ya que frecuentemente son reacciones de grupo.

4.—La *inoculación experimental* presenta dificultades superiores a las que habitualmente se observan en bacteriología, por su escasa transmisibilidad espontánea y bajo poder patógeno para los animales de laboratorio. Los animales frecuentemente empleados son el cuy, el conejo y en especial las palomas.

5.—Los *cortes histológicos*, en cuya técnica se seguirán las indicaciones del Capítulo V.

CAPITULO XXXVI

SIFILIS

El agente causal de esta enfermedad es el *Treponema pallidum* (Schaudinn - Hoffmann, 1905), que se encuentra tanto en las lesiones primarias (chancro indurado), como secundarias (placas mucosas, pápulas, etc.) y terciarias (gomas).

En ciertos períodos (secundarios) el treponema se encuentra en la sangre en forma transitoria.

MORFOLOGÍA

Examinado en estado fresco al ultramicroscopio se presenta como un filamento tenue, espiroideo de apariencia brillante sobre el fondo negro de la preparación. Esta disposición espiral se observa no solamente durante los movimientos sino también en el estado de reposo. La espiral es completa y tiene forma de tirabuzón. Está dotado de movimientos de progresión más o menos rápidos pareciendo que gira rápidamente sobre sí mismo, a manera de una hélice. A veces permanece sin trasladarse de sitio; pero ejecutando movimientos de flexión y torsión.

Después de teñido, sus detalles morfológicos aparecen mejor. El treponema es de 6 a 15 micrones de largo por 0,25 micrones de ancho. Las ondulaciones, en número de 6 a 12, son regulares, especialmente en la parte media del cuerpo. Las extremidades son afiladas y se continúan por un filamento.

Levaditi, Schoen y otros autores han concluido que el treponema es una fase de un ciclo evolutivo del virus sifilítico. Las formas granulares representarían la fase pre-espiroquetósica capaces de transformarse en treponemas cortos, posteriormente en espiroquetas más largas y ricas en ondulaciones (adultas).

Coloración. — Exige procedimientos especiales de coloración y aun éstos le dan un tinte pálido. No se tiñe por el método de Gram. Los procedimientos de coloración son numerosos; pero podemos reunirlos en tres grupos: **impregnación; coloración previa aplicación de un mordiente y coloración por los eosinatos.** De estos procedimientos el más usado es el de impregnación, el mejor de los cuales es el **método de Fontana - Tribondeau** basado en el empleo del nitrato de plata amoniacal.

CULTIVOS

La obtención de cultivos puros a partir de productos sifilíticos (trozos de órganos, exudados, etc.), es difícil. Numerosos autores han logrado obtener cultivos puros con diferentes medios de cultivo ideados para este objeto. Podemos citar, entre ellos, el medio de Noguchi, a base de una mezcla de suero de caballo, carnero o conejo y de agua destilada, adicionado de un trozo de órgano fresco de cuyo normal. Los cultivos sólo se desarrollan cuando se colocan en condiciones anaerobias y a la temperatura de 25 - 37 grados C., por lo cual se deben cubrir, después de sembrados, con una capa de vaselina líquida. Es necesario hacer bastantes siembras a la vez, pues muchas de ellas son infructuosas. La investigación debe hacerse de preferencia alrededor del trozo de órgano incluido en el medio. El *Treponema* comienza a desarrollarse desde el segundo día y vive durante cuatro o cinco semanas.

INOCULACIÓN

Roux y Metchnikoff demostraron la receptividad del *chimpancé*, semejante a la del hombre a la infección sifilítica. Los *monos inferiores* (macacos y cinocéfalos), son menos sensibles a la sífilis experimental.

El virus sifilítico es inoculable a los *conejos* por diversas vías. Por la vía ocular se observa en los primeros días una ligera reacción

banal debida a los gérmenes de asociación. La reacción específica aparece a las dos o siete semanas como pequeñas granulaciones, del tamaño de cabeza de alfiler ocupando el borde del iris. Después hay una opalescencia difusa de la córnea, sintomática de una queratitis parenquimatosa. El examen de los cortes de la córnea así atacada revela la existencia de numerosos treponemas.

Se ha inoculado, con éxito, el virus sifilítico en el testículo del conejo, que al cabo de treinta a cincuenta días presenta una masa del tamaño de un huevo de paloma, irregular, indolora y formada por la reacción epidídimo - testicular. Con la punción se extrae un líquido rico en espiroquetas puras.

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

El diagnóstico bacteriológico puede hacerse por *métodos directos* (investigación del treponema en las lesiones o productos patológicos) y por *métodos indirectos* (reacciones serológicas).

MÉTODOS DIRECTOS

1.—*Al fresco.*

a) Mediante el **microscopio** ordinario, para lo cual se necesita un foco luminoso intenso y un excelente objetivo de inmersión. Este método es sumamente inseguro, pues la gran tenuidad del microbio y su escasa refringencia le hacen difícilmente visible.

b) Mediante el **ultramicroscopio**. Constituye el método más rápido y, quizás, el más seguro para la investigación directa del treponema. Cuando el aparato está bien reglado se deposita entre porta y cubre una gotita de la serosidad recogida. El examen efectuado mediante las precauciones requeridas evidencia el treponema con todos los caracteres morfológicos y de movilidad que se le han asignado. Es necesario, sin embargo, diferenciarlo rigurosamente de los demás parásitos análogos que se encuentran en las lesiones ulcerosas de diversa naturaleza, en donde viven como saprófitos.

2.—*Por tinción.*

La investigación debe hacerse en los frotos y cortes teñidos por

alguno de los procedimientos que ya hemos enunciado. Para los cortes se usa también, como método de elección, la impregnación por las sales de plata.

Obtención del producto que se ha de examinar. — Para obtener la serosidad del chancro debe limpiarse bien la región con una tórula de algodón impregnado en suero fisiológico estéril para arrastrar las contaminaciones superficiales. La dermis se pone así al descubierto. Dejar salir un poco de la serosidad comprimiendo el contorno entre los dedos. Si no se lograra esta serosidad, escarifiqúese la superficie con una lanceta o bisturí, o si se desea hacer un frote, ráspese con el borde de un porta-objeto que servirá para extenderla en los otros porta-objetos. Para secar la preparación no debe calentarse.

La serosidad obtenida debe examinarse de preferencia sin ninguna dilución; pero si hubiera necesidad de diluirla, utilícese el suero fisiológico y no el agua, porque ésta hincha y deforma los treponemas.

Si se trata de una pápula o una roséola, escarificar ligeramente las lesiones, recoger el exudado y operar como precedentemente.

El jugo ganglionar se recoge por punción con una aguja gruesa y aspirando el líquido con una jeringa esterilizada.

Para los gomas la toma debe efectuarse a nivel de la pared mediante raspado, pues el líquido de reblandecimiento no contiene, generalmente, treponemas.

La investigación del treponema en las preparaciones de sangre da, generalmente, resultados negativos.

3.—*Por inoculación.*

Se podrá recurrir a la inoculación intraocular en el conejo, siguiendo el procedimiento de Bertarelli. Tiene el inconveniente de dar resultados tardíos, puesto que es preciso esperar el fin del período de incubación.

MÉTODOS INDIRECTOS

Ponen de manifiesto las alteraciones humorales (del suero, del líquido cefalorraquídeo), producidas por la infección sifilítica.

No poseemos reacciones específicas desde el punto de vista inmunológico; pero las reacciones más generalmente empleadas (R. de Wassermann, R. de Kahn), se consideran prácticamente específicas por su alta sensibilidad.

Se las ha clasificado en *reacción de desviación del complemento* (R. de Wassermann) y en *reacciones de floculación* (R. de Kahn, R. de Vernes, R. de Sachs - Georgi, R. del benjuí coloidal, etc.) El estudio del mecanismo de estas reacciones permite asimilar la primera a las últimas; todas son reacciones coloidales basadas en la propiedad que adquiere el suero o el líquido cefalorraquídeo del individuo sifilítico de flocular los lipoides del antígeno (mejor llamarlo reactivo), empleado en cada reacción. Sólo hay diferencias de grado entre la Reacción de Wassermann y la Reacción de Kahn, que dependen del estado de dispersión y de la riqueza en coloides lipoidicos de los antígenos empleados. En la primera fase de la R. de Wassermann (que corresponde a la fijación del complemento de la R. de Bordet - Gengou), se produciría una floculación invisible a simple vista del antígeno (reactivo), por el suero a investigar; estos finísimos flóculos adsorberían al complemento y lo inutilizarían, lo fijarían. La agregación del sistema hemolítico tendría por objeto revelar esta fijación del complemento producida, no por una sensibilizadora específica como en la R. de Bordet - Gengou, sino por la floculación invisible del antígeno que arrastra al complemento. En la R. de Kahn los flóculos que se forman son francamente visibles y esto se debe a la riqueza coloidal del antígeno de grandes micelas, que en presencia del suero del enfermo se agregan en micelas de mayor tamaño, macroscópicamente visibles. En efecto, mientras el antígeno (reactivo) de Wassermann es un extracto alcohólico o cetónico (lipoidico) de corazón de ternera, el reactivo de Kahn ha sido enriquecido por la adición de coleslerina al extracto alcohólico de corazón de buey.

TECNICA DE LA REACCION DE KAHN.

Para esta reacción se necesitan los siguientes elementos:

a) *Suero del enfermo.* — Debe ser límpido y sin grumos en suspensión, lo que se obtiene por centrifugación. Se inactiva a 56° durante media hora con el objeto de desvirtuar la seroalbúmina que inhibe la reacción.

b) *Emulsión de antígeno.* — El antígeno es un extracto, alcohólico coleslerinado de corazón de buey. La emulsión se prepara en dos tubos. En uno se coloca 1 c.c. de antígeno y en el otro la cantidad de suero fisiológico que indica el título (variable según la serie). Se mezcla vaciando el suero sobre el antígeno y se transvasa varias veces rápidamente. Se deja en reposo 10 minutos ("maduración"). Esta emulsión es utilizable solamente hasta media hora después de preparada.

Titulación del antígeno. — El título del antígeno está representado por la menor cantidad de suero fisiológico que, agregada al antígeno, produzca copos lipoidicos dispersables por la adición de nuevas cantidades de suero.

Técnica.

1.—Tomar dos series de cinco tubos para suspensión de antígeno. En la primera serie echar dosis crecientes de suero fisiológico: 0,60; 0,80; 1,00; 1,10 y 1,20 c.c. En la segunda serie echar 1,00 c.c. de antígeno coleslerinado en cada tubo.

2.—Preparar cinco suspensiones de antígeno mezclando sucesivamente uno de los tubos de antígeno con las dosis variables de suero fisiológico. Verter la solución transvasándola seis veces, lo más rápidamente posible sin esperar que caigan las últimas gotas. Dejar la mezcla en reposo durante 30 minutos.

3.—Echar 0,05; 0,025 y 0,0125 c.c. de cada suspensión de antígeno en cinco series de tres tubos cada una.

4.—Agregar 0,15 de suero fisiológico a cada uno de los 15 tubos.

5.—Agitar los tubos durante 3 minutos a la velocidad de 285 oscilaciones por minuto.

6.—Agregar 1,00 c.c. de suero fisiológico a los tubos que contengan 0,05 de antígeno y 0,50 c.c. a los restantes.

En condiciones normales, las suspensiones obtenidas por la mezcla de 0,6 y 0,8 c.c. de solución salina con 1,00 c.c. de antígeno, contienen agregados lipoidicos no dispersables, mientras que habrá dispersión completa en aquellos en los cuales el suero está en cantidades de 1,0; 1,1 y 1,2 c.c. Si, por ejemplo, presentan solución opalescente aquellos tubos que contienen suspensiones obtenidas con 1,0; 1,1 y 1,2, el título será de 1 x 1 por ser ésta la menor cantidad de suero fisiológico que produce dispersión completa.

Si todos los tubos tienen copos visibles, debe repetirse la titulación empleando volúmenes de suero fisiológico superiores a 1,2 c.c.

La reacción se verifica en tres tubos para cada suero. Se coloca el antígeno en las cantidades siguientes: 0,05 c.c. en el primer tubo;

0,025 en el segundo y 0,0125 en el tercero y se agrega 0,15 de suero del enfermo a cada uno.

Se agita tres minutos en un agitador mecánico que efectúa 275 oscilaciones por minuto con un desplazamiento de 4 centímetros. Si la agitación se prolonga, se refuerza la reacción y se atenúa en caso contrario.

Para interpretar con mayor facilidad la reacción, se agregan las cantidades siguientes de suero fisiológico: 0,5 c.c. a los dos tubos con dosis menor de antígeno (0,0125 y 0,025) y 1 c.c. al tercero. El objeto de agregar mayor cantidad de suero fisiológico en este tubo es igualar las opacidades.

La lectura debe hacerse siempre a ojo desnudo. El uso del aglutinoscopio no es recomendable porque a veces con su ayuda se ve una pequeña floculación que no debe interpretarse como positiva.

INTERPRETACIÓN. — La transcripción de los resultados se hace por cruces:

4 cruces para un floculado intenso de grumos bien formados que flotan en un líquido claro.

3 cruces para un floculado menos manifiesto.

2 cruces para un floculado pequeño que flota en un líquido turbio.

1 cruz para un floculado fino, visible, que flota en un líquido opalescente.

Se anotan las cruces de cada tubo, se suman y se dividirán por tres y este será el resultado de la reacción.

Finalmente, debemos hacer notar el hecho de que hay ciertas reacciones paradójales en que la reacción es más fuerte con la dosis mayor de antígeno que con la menor. Tales reacciones deben interpretarse como intensamente positivas.

TECNICA DE LA REACCION DE BORDET. WASSERMANN.

Los elementos necesarios para esta reacción son los siguientes:

Antígeno, representado por una emulsión alcohólica de corazón de ternera (antígeno acetónico de Bordet y Ruelens), que se diluye de acuerdo con el título del instituto que lo prepara.

Anticuerpo, representado por el suero a investigar, cuyo com-

plemento ha sido destruido por calentamiento a 56 grados media hora.

Complemento, representado por suero fresco de cuy que debe titularse previamente.

Sistema hemolítico, constituido por una suspensión de eritrocitos de cordero diluida al 5% en suero fisiológico y una dilución de hemolisina anticordero diluida también de acuerdo con el título del instituto que la prepara.

La técnica se inicia con la titulación del complemento, tiempo que es indispensable, pues se trata de un reactivo esencialmente variable, cuya actividad es diferente en los distintos animales, de acuerdo con el sexo, la estación del año, la temperatura del ambiente, etc. Titulado el complemento se pone en presencia del complejo antígeno - anticuerpo para que se produzca o no su fijación, partiendo de la base que el suero del enfermo que contiene los anticuerpos carece de complemento, ya que ha sido previamente inactivado. La adición, finalmente, del sistema hemolítico tiene por objeto comprobar si ha habido o no fijación del complemento, y hablaremos de "reacción positiva", (+), cuando ha habido fijación del complemento por el sistema antígeno anticuerpo y, por lo tanto, no ha habido hemolisis, y de "reacción negativa" (—), cuando sucede lo contrario.

En los esquemas a continuación, viene el detalle de la técnica de la reacción.

a) Titulación del complemento.

Colóquese tres tubos serológicos en el portatubos metálico. Numérense I, II, III y con pipetas graduadas colóquense las siguientes sustancias:

Tubo Núm.	I	II	III
Complemento al 1/10 c.c.	0,1	0,2	0,3
Suero fisiológico, c.c.	1,9	1,8	1,7
Hemolisina, c.c.	0,5	0,5	0,5
Susp. eritrocitos al 5 x 100	0,5	0,5	0,5

Se lleva al baño María y se observa el último tubo que ha hemolizado a los 5 minutos, cantidad que se considera como la dosis mínima de complemento. Supongamos que en este caso sea 0,2.

b) *Fijación del complemento.*

En 4 tubos serológicos numerados de 1 a 4, colóquense:

Tubo Núm.	I	II	III	IV	Control
Antígeno	0,5	0,5	0,5	0,0	
Suero enfermo	0,3	0,3	0,3	0,3	
Complemento. - Título a dosis variables	0,2	0,4	0,6	0,2	
Suero fisiológico	0,4	0,2	0,0	0,9	

c) *Adición del sistema hemolítico.*

Después de transcurrir el tiempo indicado, complétese la reacción añadiendo a los mismos 4 tubos:

Tubo Núm.	I	II	III	IV	Control
Hemolisina, c.c.	0,5	0,5	0,5	0,5	
Susp. eritrocitos, c.c.	0,5	0,5	0,5	0,5	

Agítense y llévense nuevamente los tubos al bañomaria a 37° durante 5 minutos. Obsérvese si hay o no hemolisis en los tubos 1, 2 y 3. El tubo número 4 deberá estar hemolizado, salvo el caso de un suero humano anticomplementario. Indíquese el resultado de la reacción con los signos:

- Si hay hemolisis en todos los tubos de reacción: negativo. (—).
- Si no hay hemolisis en el primero y la hay en los demás. (+).
- Si no hay hemolisis en los dos primeros tubos. (++)
- Si no hay hemolisis en ninguno de los tres tubos. (+++).

INTERPRETACIÓN DE LAS REACCIONES SEROLÓGICAS. — Los anticuerpos en juego en las reacciones de floculación y la reacción Wassermann son testigos de infección y no de inmunidad. Estas reacciones son todas reacciones de infección. Aparecen en los períodos de evolución y se atenúan o desaparecen en los períodos de latencia.

La reacción de Wassermann se hace, generalmente, positiva hacia el final del período primario (20° ó 25° día de la evolución del chancro.

El porcentaje de positividad alcanza al 95% en el período secundario, después disminuye al 60% en los períodos de latencia aparente, pero en este momento una reacción positiva indica una sífilis activa.

En las complicaciones nerviosas se hace positiva en el 60% de los casos, y en el 100% de los casos de parálisis general cuando se investiga en el líquido céfalo raquídeo.

En la sífilis hereditaria la proporción de reacciones positivas no alcanza sino al 20%.

En el período secundario, el tratamiento provoca casi siempre, junto con la desaparición de las lesiones, la atenuación y aun la desaparición temporal de la reacción de Wassermann. Sin embargo, en aquellos casos de sífilis con reacciones negativas, el comienzo del tratamiento puede hacer positivas las reacciones (método de reactivación).

Por último, en el período terciario, en la sífilis nerviosa y aun en los casos de sífilis viscerales indiscutibles, la reacción no es siempre positiva; conviene, entonces, recordar que si una reacción negativamente positiva puede dar el diagnóstico, una reacción negativa no debe, jamás, hacer rechazar el diagnóstico de sífilis.

CAPITULO XXXVII

INFECCIONES PUTRIDAS Y GANGRENOSAS

MICROBIOS ANAEROBIOS

GENERALIDADES

Las infecciones pútridas y gangrenosas están caracterizadas por la importancia del edema, la destrucción necrótica de los tejidos y la presencia, a veces, de gas y olor fétido. Son procesos complejos en cuanto a su localización múltiple, su etio - patogenia y sintomatología. No existe un germen específico de tales infecciones y su complejidad se revela también en la flora microbiana causal. Los anaerobios, asociados comúnmente a los aerobios constituyen un "polimicrobismo" necesario, según algunos autores (Veillon, Zuber, etc.), a la creación del foco gangrenoso. La intensa acción proteolítica de esas especies microbianas, explica la destrucción necrótica y la acción pútrida sobre los tejidos.

Las indicaciones diagnósticas se hallan en estricta relación con las localizaciones de los gérmenes anaerobios: tubo digestivo, aparato génito - urinario y en el suelo como igualmente por las circunstancias de encontrárselos en las cavidades cerradas, en focos necróticos y esfacelados privados del oxígeno libre.

Se pensará en infecciones a anaerobios, en las ulceraciones, abscesos o flegmones dependiente del tubo digestivo. Fuera de la angina de Vincent y de la estomatitis ulcero - membranosa las que, por su asociación fuso - espirilar se describen aparte, conviene recordar, como indicaciones diagnósticas, el absceso dentario, la angina de Ludwig, los flegmones peri - esofágicos, los abscesos subfrénicos, las apendicitis y abscesos y gangrenas peri - apendiculares, las peritonitis enquistadas por perforación, los abscesos del hígado y las colecistitis.

Los órganos vecinos del tubo digestivo o las cavidades del cráneo que se comunican con él son susceptibles de la invasión de los anaerobios. Así se ex-

plica que las vías respiratorias puedan infectarse por los anaerobios: gangrenas pulmonares, pleuresías pútridas enquistadas o no, sinusitis, otitis o mastoiditis.

Las infecciones del aparato génito - urinario pueden infectarse con gérmenes análogos: abscesos urinarios, pielitis, flegmones perinefríticos, bartolinitis, metritis y salpingitis, infecciones puerperales o en el post - abortum.

Las circunstancias por las cuales se desarrollan ciertas infecciones, hacen sospechar, a veces, la posibilidad de anaerobiosis. Complicaciones a distancia por embolia o septicemia de una infección anterior digestiva o génito - urinaria: absceso cerebral, embolías o gangrenas pulmonares, de los niños o adultos atacados de otitis, etc.

En los casos de traumatismo, de herida contaminada con tierra, materias fecales o cadavéricas, la presencia de anaerobios debe ser investigada ya que en esas circunstancias se constituyen las gangrenas gaseosas. Los anaerobios tienden a multiplicarse mejor en los tejidos mortificados, atricionados y en donde la circulación sanguínea se halla interrumpida.

Ciertos signos clínicos hacen pensar en la presencia de anaerobios: colecciones gaseosas, fetidez (desgarro fétido de las gangrenas pulmonares; vómica fétida en las aberturas bronquiales de la pleuresía).

DIAGNÓSTICO BACTERIOLÓGICO

Examen directo. — La morfología no permite por sí sola identificar un anaerobio, pero suministra útiles signos de presunción. En gota colgante o en frotis después de coloración de Gram, los anaerobios revisten aspectos múltiples, en cocos o bacilos. Muchos de los bacilos son gruesos y traposos y toman el Gram (Perfringens, Vibrión séptico, Sporogenes, etc.); bacilos finos (Ramosus); bacilos Gram negativos (Fusiforme, Fragilis, etc.); por coccus (Micrococcus foetidus, Diplococcus reniformis, Estreptococos, Estafilococos, etc.); o bien espirilos anaerobios.

La movilidad de los gérmenes ayudará a circunscribir el diagnóstico teniendo cuidado de observar al fresco en la porción central de la preparación para evitar la inmovilización periférica de la gota analizada.

A menudo estas diferentes especies se hallan asociadas dificultando el diagnóstico y obligando a recurrir a la identificación por aislamiento.

Examen por cultivo. — Es indispensable para el aislamiento y la identificación. Además de sembrar en los medios aerobios (asociación frecuente), emplear los medios de cultivos para anaerobios (agar glucosado profundo de Veillon, caldos regenerados, etc.),

obtener desarrollo puro de las especies e identificarlas por los medios diferenciales y la aglutinación.

TECNICA:

Licuar el agar profundo de Veillon al baño maría manteniendo los tubos sumergidos en el agua en ebullición durante 20 minutos para expulsar completamente el aire disuelto. Colocarlos en agua a 40° para mantener el medio al estado líquido. Sembrar el producto sospechoso con pipeta en un primer tubo. Con la misma pipeta sembrar un segundo tubo sin volver a tomar el producto patológico. Del segundo tubo se pasa a un tercero, etc., con el objeto de obtener con seguridad colonias escasas y aisladas en los últimos tubos, (siembra por agotamiento).

Anotar la característica macroscópica de las colonias (opacas, lenticulares, contornos netos, algodonosas, ausencia o presencia de burbujas gaseosas, dislocación del agar, olor, etc.).

Escoger una colonia aislada típica y resembrar para obtener cultivos puros. Se utiliza una pipeta afilada provista de un tubo de goma de treinta a cuarenta centímetros, que permita aspirar sin dificultad los movimientos de la pipeta. Si el número de colonias especialmente en la superficie dificulta la anterior operación, extraer el trozo de agar en una placa de Petri calentando el fondo del tubo de Veillon. Cauterizar la superficie y extraer la colonia sospechosa.

Identificación. — Una vez aisladas las colonias se sembrarán en los medios diferenciales líquidos o sólidos privados del oxígeno libre por el vacío por gases inertes o por regeneración mediante la ebullición.

Con cultivos en caldo proceder a las "pruebas de aglutinación".

INTERPRETACIÓN.—La asociación microbiana aero-anaerobia es de gran importancia en la interpretación diagnóstica, pronóstica y terapéutica. La asociación con estreptococos es una causa de difusión de los procesos anaerobios y de su gravedad (heridas de guerra, traumatismos, etc.).

En las supuraciones viscerales anaerobias es útil evidenciar la presencia de estreptococos hemolíticos para la indicación seroterápica mixta.

La abundancia extrema de la flora microbiana que hace contraste con la pobreza de los elementos celulares constituye una fuerte presunción diagnóstica de las infecciones gangrenosas.

PRINCIPALES ESPECIES ANAEROBIAS

BACILOS ANAEROBIOS GRAM POSITIVOS.

B. PERFRINGENS.

Bacilo grueso, traposo, inmóvil, rara vez esporulado. En Agar - Veillon colonias opacas en "lentes biconvexas" y formación gaseosa. En caldos olor butírico, pero no pútrido. Intenso fermento sacaro - proteolítico.

B. BIFERMENTANS.

Caracteres análogos al Perfringens, pero produce fácilmente esporas ovales centrales. Olor pútrido como Sporogenes. Más proteolítico (albúmina de huevo, leche y gelatina).

VIBRION SEPTICO. (B. DEL EDEMA MALIGNO).

Poliformo, bordes redondeados, esporas centrales, no capsulado. Móvil. En Agar - Veillon colonias compactas algodonadas. Gas. En caldos olor a putrefacción (H₂S).

B. SPOROGENES.

Iguals caracteres que el Vibrion Séptico. Esporas abundantes, subterminales. Muy móvil. Agar - Veillon gruesas colonias algodonosas. Gas sin fragmentación del medio. Caldo: olor pútrido, infecto. Proteolítico.

B. OEDEMATIENS.

Como el Perfringens, pero bordes redondeados, esporas redondas en raquetas, subterminales. Agar - Veillon colonias opacas, contornos irregulares, filamentosos.

B. HISTOLITICO.

Análogo al vibrion séptico. Móvil, capsulado, poco esporulado. En Agar - Veillon colonias con núcleo central irregular y aureola filamentosas ramificadas. Caldos: olor pútrido sin formación gaseosa.

B. PUTRIFICUS. (BIENSTOCK).

Bacilo fino, flexuoso, espora terminal (palillo de tambor). Muy móvil. Colonias pequeñas, opacas al centro y filamentosas a la periferia. Olor pútrido. Proteolítico.

B. RAMOSUS.

Bacilos largos en V. Inmóvil. No esporula. Cultivo difícil, colonias pequeñas filamentosas. Olor fétido. Frecuente en las gangrenas pulmonares, pleuresías pútridas, otitis y apendicitis.

BACILOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVOS.

(Conjuntamente con el *B. Ramosus*, Gram positivo, los gérmenes siguientes son los anaerobios de las infecciones del tubo digestivo, apendicitis, de los abscesos urinarios, otitis e infecciones gangrenosas del pulmón y pleura).

B. FUSIFORME. (VINCENT).

Bacilo inmóvil, netamente fusiforme de difícil cultivo. (Ver asociación fuso - espirilar).

B. FRAGILIS.

Fino, inmóvil, de difícil coloración. Colonias pequeñas, muriformes, olor fétido, sin o poco gas. Frecuente en las caries dentarias.

B. SERPENS.

Grueso, extremidades redondeadas, movimiento ondulante. Colonias transparentes. Olor fétido.

COCOS ANAEROBIOS. GRAM POSITIVOS.

STREPTOCOCOS.

Largas cadenas. Gas. Olor pútrido.

STAFILOCOCOS.

Cocos pequeños. Colonias finas. Infecciones urinarias.

MICROCOCCUS FOETIDUS.

Cortas cadenas. Olor fétido. Sin gas. Anginas de Ludwig, otitis. Bartholinitis.

COCOS ANAEROBIOS GRAM NEGATIVOS.

DIPLOCOCCUS RENIFORMIS.

Caracteres morfológicos del Gonococo. Agar - Veillon colonias lenticulares transparentes. Abscesos urinarios y hepáticos.

STAFILOCOCCUS PARVULUS.

Cocos pequeños, colonias cuboideas, amarillas. Olor fétido.

ASOCIACION FUSO - ESPIRILAR.

Estomatitis, anginas, infecciones úlcero - membranosas. Frecuente en la angina úlcero - necrótica de Vincent.

El diagnóstico se hace por simple examen directo. Ambos elementos de la asociación (*B. fusiforme* y *Espiroqueta Vincent*) son Gram negativos. Difícilmente cultivables.

APÉNDICE

APENDICE*

IDENTIFICACION SISTEMÁTICA DE UN GERMEN AISLADO. MÉTODO A SEGUIR.

Después de obtener un *cultivo puro* de un microorganismo del medio ambiente o de los productos patológicos y de anotar *el origen, la fecha, consideraciones clínicas*, se procede a su estudio, siguiendo en lo posible la siguiente norma recomendada:

ASPECTO MORFOLOGICO DE LA BACTERIA.

Los principales puntos que deben notarse son los siguientes:

Forma. — (Esféricas, bacilos cortos y largos, filamentos, comas o espirales, etc.).

Eje. — (Derecho o curvo).

Tamaño. — (Largo y ancho).

Lados. — (Paralelos, protuberantes, cóncavos, irregulares, etc.).

Extremos. — (Redondeados, truncos, cóncavos, en punta, etc.).

Disposición. — (Aislados, en pares, en cadenas, de a cuatro, en grupos, en racimos, en agrupaciones cúbicas, en gavilla, en letras chinas, etc.).

Formas anormales o de involución. — (Variaciones en forma y tamaño; en masa, filamentosas, ramificadas, naviculares, en forma de limón, fusiforme, etc.).

Movilidad. — (Móvil o inmóvil, caracteres de los movimientos, etc.).

Cilios. — (Monotrico, anfitrico, lofotrico, peritrico, etc.).

Esporas. — (Esféricas, ovaladas o elípticas; centrales, subterminales o terminales; únicas o múltiples; producen o no producen ensanchamiento del bacilo, etc.).

* Con el objeto de facilitar la identificación de los microorganismos aislados, hemos resumido en este apéndice los procedimientos principales y que se hallan en su totalidad en el texto pero dispersos en los distintos capítulos. Creemos será de utilidad para los médicos, laboratoristas y bacteriólogos.

Cápsulas. — (Presentes o ausentes, condiciones de aparición, etc.).

Coloración. — (Homogénea, irregular, unipolar, bipolar, granular, negativa y variaciones en intensidad entre los diferentes organismos. Presencia de gránulos metacromáticos; reacción a las coloraciones de Gram y de Ziehl-Neelsen, etc.).

COLONIAS EN SUPERFICIE EN MEDIOS SOLIDOS.

Formas. — (Circulares, irregulares, radiadas, arborescentes, etc.).

Tamaño. — (En milímetros).

Elevación. — (Planas, solevantadas, ligeramente convexas, muy convexas o en forma de cúpula, umbilicadas, con o sin margen aserrado, etc.).

Estructura y superficie. — (Amorfa, lisa, mediana o toscamente granular; filamentosas, rizada, rugosa, en anillo, opaca o brillante, etc.).

Borde. — (Entero, ondulado, lobulado, festoneado, dentado, como con flecos, rizado o aplastado, etc.).

Color. — (Color por luz reflejada y transmitida; iridescente, fluorescente, opalescente, etc.).

Consistencia. — (Mucosa, viscosa, friable, membranosa, etc.).

Capacidad de emulsionarse. — (Fácil o difícil; emulsiones homogéneas, granulares o escamosas cuando se emulsiona en una gota de agua con un asa de platino).

Diferenciación. — (Se diferencian o no en una porción central y periférica).

DESARROLLO EN ESTRIA CENTRAL.

Grado. — (Ninguno, escaso, moderado, abundante, profuso; discreto o confluyente).

Forma. — (Filiforme, invasor, arborescente).

Elevación. — (Aplastada o solevantada).

Superficie. — (Lisa; limitada, como cobre batido; rugosa; fina, moderada o toscamente granular; papilar, secas o húmedas).

Bordes. — (Entero, ondulado, lobulado, festoneado, dentado, como con flecos, aplastados).

Color, opacidad, consistencia y capacidad de emulsionarse. — (Como en las colonias).

Olor. — Ausente, pronunciado, semejante a otro olor.

Medio. — Coloreado, digerido; formación de cristales.

DESARROLLO EN PICADURA.

Grado. — Como en el cultivo en estria central. También posición de desarrollo óptimo.

Forma. — Filiforme, en forma de rosario, sin o con ramificación.

Extensión. — Profundidad en el tubo en que hay desarrollo.

Superficie. — Desarrollo en la superficie presente o ausente; si lo hay, diámetro, superficie y borde.

Color y opacidad. — Como en el cultivo en estria central.

Licuefacción. — Presente o ausente; si la hay, crateriforme, piriforme, infundibuliforme, estratiforme, etc.

Medio. — (Como para el cultivo en estria central).

DESARROLLO EN AGAR PROFUNDO.

Posición. — (Desarrollo uniforme en el tubo; desarrollo óptimo o máximo, zonas, etc.).

Superficie. — (Desarrollo en la superficie: zona de aerobiosis).

Colonias. — (Tamaño, forma, color, opacidad, desarrollo periférico si lo hay).

Gas. — (Presente o ausente; medio fragmentado).

Medio. — (Coloreado, digerido, turbio).

DESARROLLO EN MEDIO LIQUIDO.

Grado. — (Ninguno, escaso, moderado, abundante, etc.).

Enturbiamiento. — (Presente o ausente; si lo hay, ligero, moderado o intenso; uniforme, granular o flocular).

Depósito. — (Presente o ausente; ligero, moderado o abundante; pulverulento, granular, flocular, membranoso o viscoso; al agitarlo se disgrega completamente, o no se disgrega).

Desarrollo en la superficie. — (Presente o ausente; desarrollo en anillo alrededor de la pared del tubo; velo de la superficie, que es delgado o grueso, con superficie lisa, granular o rugosa, se disgrega completamente o no se disgrega al agitarlo, etc.).

Olor. — (Ausente, pronunciado o semejante a otro olor, etc.).

DESARROLLO EN AGAR - SANGRE.

Colonias. — Descripción de las colonias de la superficie.

Hemolisis. — (Presente o ausente; caracteres, extensión, etc.).

RESISTENCIA AL CALOR.

(Generalmente se prueba colocando un cultivo de caldo de 24 horas, que contenga 5 c.c. de medio en un tubo de ensayo de 5/8 pulgadas, en un baño-maria a temperaturas de 55 grados por una hora, 60 grados por una hora y 80 grados por media hora, y se subcultivan en medios favorables. Esta es, por supuesto, una prueba de orientación).

PROPIEDADES METABOLICAS.

Presión de oxígeno que se requiere para el desarrollo. — (Aerobio, anaerobio facultativo, anaerobio obligatorio, microaerofílico).

Efecto de la temperatura sobre el desarrollo. — (Límites entre los que ocurre el desarrollo; óptimo térmico).

Formación de pigmento. — (Se prueba generalmente en agar estria incubado a 22 grados, o se dejan a temperatura de laboratorio después de una incubación preliminar a 37 grados).

Capacidad de modificar la constitución del medio. — (Efecto sobre el desarrollo por la adición al medio de sangre, suero, líquido ascítico, glucosa, glicina, nitrato de potasio, sales biliares u otras sustancias).

REACCIONES BIOQUIMICAS.

Fermentación de azúcares. — (Acido, gas, reducción, etc.).

Leche tornasolada. — (No hay cambio; reacción ácida o alcalina; coágulo; coágulo disgregado por el gas; peptonización; saponificación).

Indol. — (Ver técnicas en el Cap. VIII).

Prueba de Rojo de Metilo. — Se prueba agregando 5 gotas de solución rojo de metilo de 0,04% a un cultivo en medio glucosado fosfatado (peptona 0,5 gramos, K_2HPO_4 0,5 gramos, glucosa 0,5 gramos, agua 100 c.c. pH 7,5). El cultivo se desarrolla durante 5 días a 30 grados.

Color rojo = positivo,

Color amarillo = negativo.

Prueba de Voges-Proskauer (V. P.) — Se prueba agregando a un cultivo glucosado fosfatado cultivado durante 5 días a 30 grados, 1 c.c. de solución de KOH al 10%. El color se desarrolla lentamente, y la prueba debiera leerse después de 18 a 24 horas.

Fluorescencia = negativa.

Si no hay coloración = negativa.

Reducción de nitrato. — Se prueba en cultivo en caldo que contenga 0,1% KNO_3 cultivado durante 5 días a 37 grados, por el método de Ilosvay.

Solución A:

a-naftilamina 1 gm.
agua 22 c.c.

Se disuelve, se filtra y en seguida se agrega 180 c.c. de ácido acético diluido. (Sp. gr. 1,04).

Solución B:

Acido sulfanílico 0,5 grm.
Acido acético diluido 150 c.c.

Agregar 1 c.c. de Solución A y en seguida 1 c.c. de solución B.

Color rosado, rojo o marrón = positiva.

Si no hay coloración = negativa.

Amoniaco. — Se prueba en cultivo de agua peptonada cultivado durante 5 días a 37 grados, agregándole reactivo de Nessler.

Color café = positiva.

Amarillo pálido = negativa.

Hidrógeno sulfurad. — Se prueba en medio con acetato de plomo (caldo de extracto del corazón que contenga 4% de peptona y 2,5% de agar). Se esteriliza y se le agrega igual cantidad de solución estéril de acetato básico de plomo al 0,1%).

Coloración café o negra = positiva.

Si no hay coloración = negativa.

Reductasa Azul de Metileno. — Se prueba en un cultivo de caldo de 24 horas a 37 grados. Se le agrega 1 gota de 1% de azul de metileno en solución acuosa y se incuba a 37 grados.

Decoloración completa = muy positiva.

Coloración verde = débilmente positiva.

Si no hay decoloración = negativa.

Catalana. — Se prueba en cultivo de agar estria de 24 horas a 37 grados. Se vierte sobre el cultivo 1 c.c. de H_2O_2 (10 vols.) y el tubo se fija en una posición inclinada.

Si se producen burbujas = positiva.

Si no se produce gas = negativa.

Poder proteolítico. — (Gelatina, clara de huevo, suero coagulado, caseína, etc.).

pH óptimum. — (Límites del pH para el cultivo, la conservación, toxicidad, virulencia, etc.).

Rojo neutro. — (Cultivo en Tubo B., caracteres, reducción, fluorescencia, etc.).

Bilis o sales biliares. — (Acción nula, inhibidora, bactericida, litica, etc.).

NOTA: Para completar el estudio del microorganismo con otras reacciones bioquímicas, serológicas, poder patógeno, etc., ver los capítulos que tratan en particular el tema.

INDICE ALFABETICO (*)

	<u>Pág.</u>		<u>Pág.</u>
A cidificación	69	B acilo Acidófilo de Moro	189
Actinomicosis	129	.. Carbuncoso	48, 51 113
Agar-Agar; preparación	22	.. Piciánico	48, 68 126
— plomo	70	.. Prodigiosus	48, 68
Aglutinación, 78, 79,	90	.. de Koch	49, 227
Aislamiento de los microbios	29	.. Violaceus	68
Albúmina de huevo, medio de	71	.. de Pfeiffer	158
Alergia	95 Bordet-Gengou	158
Alexina	84 Dukrey	158
Amilosa	65 Wicks	164
Anaerobios,	137, 260 Mórax-Axenfeld	165
Anafilaxia	95 la difteria	166
Anatoxinas	103, 122 171 Hoffman	166
Anestesia (Ver autopsias)	57	.. Cuti communi	166
Anergia	95	.. de la xerosis	166
Animales, observación de los	58	.. Difteromorfos	177
Antianafilaxia	97	.. Bífido de Tissier	187
Antiformina	237	.. Botulínico	183
Antiseptia	17	.. de Nicolaier	179
Antitoxinas	76	.. Búlgaro de Grigoroff	188
Antivirus	103	.. Acidófilo de Moro	189
Asepsia	17	.. Coli y variedades	193
Asociación fuso-espirilar	264	.. de Friedlander	197
Autoclave de Chamberland	16	.. Fecalis alcalígenes	198
Autofagia	75	.. de Eberth	203
Autopsias	56	.. Paratíficos	203
Autovacunas	104	.. de Shiga	203
Azul de metileno	43	.. Disentéricos	211

(*) Los números en "negrita" significan que el tema se halla desarrollado en varias páginas a partir del indicado.

	Pág.
Bacilo Pseudocarbuncoso	117
" Perfringens	263
" Anaerobios	260
" Fusiforme	264
Bacillus Anthracis	113
" Megaterium	118
" Mesentericus	118
" Mycoides	118
" Proteus	199
" Pseudotetanicus	118
" Subtilis	118
Bacteriolisis	83
Bacteriófago	103, 220
Blenorragia	150
Botulismo	183
Brucelosis	223
Bujías Chamberland	13
" Berkefeld	13
" regeneración de las	14
C aldo Martín	21
Cápsulas, coloración de	52
Carbunco	113
Caseína, caseosa	66
Castellani, Reacción de	80
Células reticulares	72
" endoteliales	73
" de Kupfer	73
Cilios	52
Citolisis	83
Clasificación de Kauffmann - White	217
Coaglutininas	79
Colonias lisas	48
" rugosas	48
" aisladas	53
" hijas	50
Coloración vital	40
" Método de Gram	44
" de Johne	52
" de Ziehl-Neelsen	228
" de Moller	53
Colorantes	41

	Pág.
Complemento	84
Conjuntivitis	164
Control de la temperatura	16
Coprocultivo	206
Coqueluche	158
Corynebacterium ver Difteria	
Corpúsculos metacromáticos	52
Cristal violeta	52
Cromogénesis	43
Cultivos	25, 53
Cuti-reacciones	97
Cuyes, peso de los	62
D esinfección	17
Dextrinasa	65
Diastasas microbianas	64
Dick, Reacción de	136
Difteria	166
Dimensiones microbianas	51
Disociación microbiana	48, 152, 201
Dosis Mínima Mortal	77
" Protectora	108
E ctoplasma	51
Electrolitos en la aglutinación	82
Endoplasma	52
Enterococo	138, 145
Ergia	94
Escala de Brown	101
Esquizomicetos	47
Esterilización. Definición. Cla- sificación	11
" de las vacunas	102
Espermocultivo	150
Esplenocitos	73
Esporas	53
Estafilococos	119
Estreptococo	145
" Viridans	131, 133
" Anaerobios	137
" Lácticos	190

	Pág.
Estreptococcias	131
Estructura microbiana	51
Estufas de cultivo	31
Exotoxinas	121
F actores de defensa	72
" celulares	72
" humorales	76
Fagocitosis	72
Fenómenos de Zona	78
" " Pfeiffer	83
" " Arthus	96
" " Neufeld	140
Fermentación	64, 186
Fermentos solubles	64
" figurados	64
" lácticos	186
Fiebre ondulante	223
Filtración, esterilización por	12
Fisiología microbiana	63
Floculación	77
Fucsina fenicada	43
G angrena gaseosa	260
Gas, producción de	69
Gelatina	23, 71
Gelatinasa	66
Gonococo	146
Gram, coloración de	44
Grupos sanguíneos	88
H aptenos	141
Hemoaglutinación, ver grupos sanguíneos	
Hemolisinas	67, 83, 121
Hemolisis	83
Hemotoxinas	67
Hiperergia	94
Histiocitos	73

	Pág.
Horno Pasteur: Descripción	15
Hongos patógenos	245
I dentificación microbiana	265
Inclusiones, cortes de órganos	45
Indol	71
Inflamación	128
Inframicrobios	109
Intestino, microbiología normal	138
Intoxicaciones alimenticias	216
Inulasa	65
Involución, formas de	51
Isoaglutinación	88, 92
Inmidad activa	99
" pasiva	105
Inoculaciones	56
L actasa	65
Leche, desarrollo en	55, 69
Leucocidinas	68, 121
Leuco-derivados	67
Leucotoxinas	67
Loewenstein, método de	240
M acrófagos	72
Medios bacteriostáticos de Hud- leson	225
" de cultivo: definición, condiciones, clasifica- ción, etc.	18
" de Loewenstein	239
" " Pérgola	175
" " M. N.	139
" " Sauton	230
" " T. de Cotoni	139
" " Würtz	197, 207
Membrana de los microbios	51
Meningitis cerebro-espinal	156
Meningococo	146

INDICE GENERAL

PROLOGO	5
PRIMERA PARTE	
I.—Esterilización	11
II.—Medios de cultivo	18
III.—Siembras, aislamientos y estufas	25
IV.—Técnica microscópica y ultramicroscópica	32
V.—Examen microscópico de los microbios	39
VI.—Morfología microbiana y estudio de los cultivos.....	47
VII.—Inoculaciones y autopsias	56
VIII.—Fisiología microbiana	63
IX.—Factores celulares de defensa	72
<i>Sistema retículo-endotelial (S. R. E.)</i>	
X.—Factores humorales	76
<i>Poder antitóxico.</i>	
" <i>precipitante. Flocculación.</i>	
" <i>aglutinante.</i>	
XI.—Factores humorales	83
<i>Poder lítico (Bacteriolisis y citolisis)</i>	
<i>Reacción de Bordet-Gengou.</i>	
XII.—La hemoaglutinación	88
<i>Grupos sanguíneos.</i>	
XIII.—Poder reaccional del organismo y sus variaciones	94
<i>Hiperergia.</i>	
<i>Anergia.</i>	
<i>Alergia.</i>	
<i>Anafilaxia.</i>	
XIV.—Vacunas	99
<i>Auto y heterovacunas.</i>	

XV.—Sueros	105
<i>Sueros antitóxicos.</i>	
" <i>antimicrobianos.</i>	
" <i>mixtos.</i>	
" <i>contra los inframicrobios.</i>	

SEGUNDA PARTE BACTERIOLOGIA ESPECIAL

XVI.—Carbunco	113
<i>Bacillus Anthracis.</i>	
<i>Bacilos pseudocarbuncosos.</i>	
XVII.—Gérmenes piógenos	119
<i>Estafilococo.</i>	
<i>Tetrágeno.</i>	
<i>Bacilo piociánico.</i>	
<i>Examen bacteriológico del pus.</i>	
<i>Inflamación.</i>	
XVIII.—Estreptococcias	131
<i>Estreptococo piógeno.</i>	
<i>Streptococcus scarlatinae.</i>	
<i>Streptococos anaerobios.</i>	
XIX.—Neumococo y enterococo	138
XX.—Gonococo y meningococo	146
<i>Pseudo-meningococos.</i>	
XXI.—Bacilos hemoglobínófilos	158
<i>Bacilo de Pfeiffer.</i>	
" " <i>Bordet-Gengou.</i>	
" " <i>Ducrey.</i>	
XVII.—Microbios de las conjuntivitis	164
<i>Bacilo de Weeks.</i>	
" " <i>Morax-Axenfeld.</i>	
XXIII.—Difteria	166
<i>Grupo Corynebacterium.</i>	
<i>Bacilo de Klebs-Loeffler.</i>	
<i>Bacilos difteromorfos.</i>	
XXIV.—Tétanos	179
<i>Bacilo de Nicolaier.</i>	
XXV.—Botulismo	183
<i>Bacilo botulínico.</i>	

XXVI.—Microbiología normal del intestino	186
<i>Fermentaciones y putrefacciones.</i>	
<i>Fermentos lácticos.</i>	
XXVII.—Grupo coli y otras especies intestinales	193
<i>Bacilo coli.</i>	
<i>Neumobacilo de Friedlaendler.</i>	
<i>Bacillus fecalis alcaligenes.</i>	
" <i>Proteus.</i>	
XXVIII.—Grupo tífico paratífico	203
XXIX.—Bacilos disentéricos	211
XXX.—Salmonellosis	216
<i>Intoxicaciones alimenticias.</i>	
XXXI.—Bacteriófago	220
XXXII.—Brucellosis	223
XXXIII.—Tuberculosis	227
<i>Bacilo de Koch.</i>	
XXXIV.—Diagnóstico bacteriológico de la tuberculosis	236
XXXV.—Hongos patógenos	245
XXXVI.—Sífilis	250
<i>Reacción de Wassermann.</i>	
" " <i>Kahn.</i>	
XXXVII.—Infecciones pútridas y gangrenosas	260
<i>Principales especies anaerobias.</i>	
APENDICE	267
<i>Tabla para la identificación microbiana.</i>	