

Dr. ABEL

Manual

de

Técnica Bacteriológica

MANUEL MARÍN
EDITOR
BARCELONA

16

BACTERIOLOGÍA-MICROGRAFÍA

J. GANZER

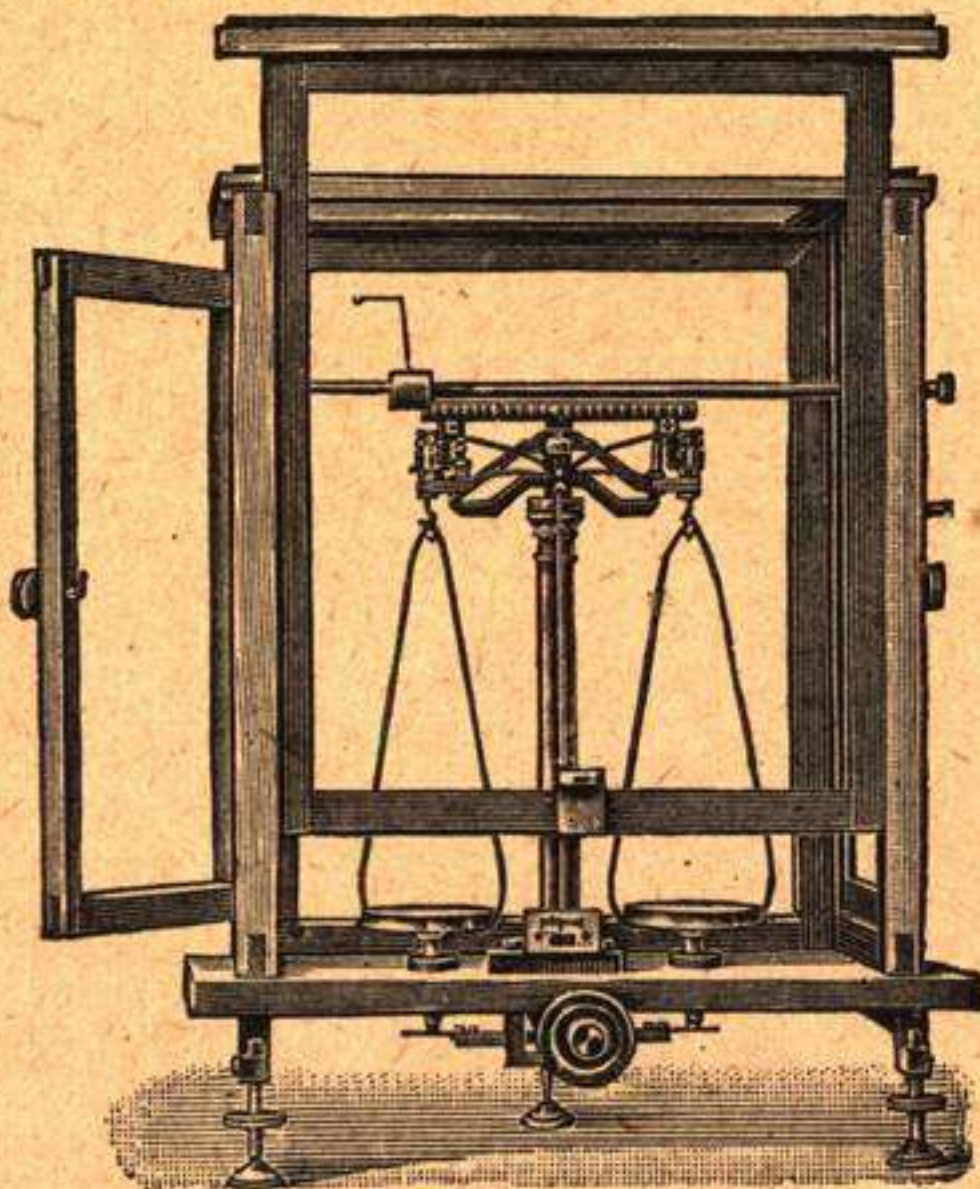
Plaza Santa Ana, 17. — BARCELONA



Gran depósito
de microscopios y accesorios
Modelos especiales
para bacteriología,
microtomos de todas clases

Estufas para cultivos y medios de cultivo,
autoclaves instalaciones de laboratorio

Colorantes especiales de la casa **Grübler y C.ª**
para bacteriología y micrografía



VIII / 1206 4189
50
ACADEMIA QUÍMICO-FARMACÉUTICA

Y

Laboratorio de Análisis

DIRIGIDOS POR LOS DOCTORES

D. MANUEL MASCAREÑAS

Y

D. ENRIQUE CALVET

Farmacéuticos

ENSEÑANZA

DE LAS FACULTADES DE FARMACIA, CIENCIAS,
PREPARATORIO DE LA DE MEDICINA
Y DE LA QUÍMICA EN TODOS SUS RAMOS

ANÁLISIS

INDUSTRIALES, CLÍNICOS Y DE PRODUCTOS
COMERCIALES Y AGRÍCOLAS

CURSOS

ESPECIALES DE ANÁLISIS CLÍNICOS EN SU DOBLE
ASPECTO QUÍMICO Y BACTERIOLÓGICO
PARA MÉDICOS Y FARMACÉUTICOS

Cortes, 596, principal. — BARCELONA

De 10 á 1 y de 4 á 7

OBRA NUEVA

DE FAMA UNIVERSAL

GUÍA PRÁCTICA
DE
ANÁLISIS
DE ORINAS

PARA USO DE

Médicos, Farmacéuticos y Químicos

POR EL

Dr. KARL KONYA

Farmacéutico-jefe y químico del Hospital y Sanatorio
de San Spiridión, en Jassy (Rumanía)

TRADUCIDO DIRECTAMENTE DEL ALEMÁN

POR EL

DR. ENRIQUE MOLES ORMELLA

Profesor auxiliar de la Facultad de Farmacia

*Un magnífico volumen en 8.º, con grabados
y cinco tablas para la fácil determinación
del ácido úrico, de la urea y de la glucosa,
muy bien encuadernado en flexible con
tela inglesa*

Ptas. 3

Juan D^{te} Gomis
Sr en primer - y Marín
calle Príncipe
Frente a Barroto

MANUAL
DE
TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

GH Natural
171

Manual de Técnica

Bacteriológica

CONTENIENDO LAS MÁS IMPORTANTES INDICACIONES TÉCNICAS PARA LOS TRABAJOS DE LOS LABORATORIOS DE BACTERIOLOGÍA,

— POR EL

Dr. Rudolf Abel

CONSEJERO MÉDICO PRIVADO, EN BERLÍN

TRADUCCIÓN DIRECTA DE LA 11.^a EDICIÓN
— ALEMANA, POR EL

Dr. Enrique Moles Ormella

PROFESOR AUXILIAR DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE BARCELONA, Y CON UN PRÓLOGO DEL PROFESOR

— **R. TURRÓ** —

DIRECTOR DEL LABORATORIO MICROBIOLÓGICO MUNICIPAL DE BARCELONA



— **BARCELONA**
MANUEL MARÍN, EDITOR
Cortes, 594 — 1908

Manual de Técnica

Bacteriología

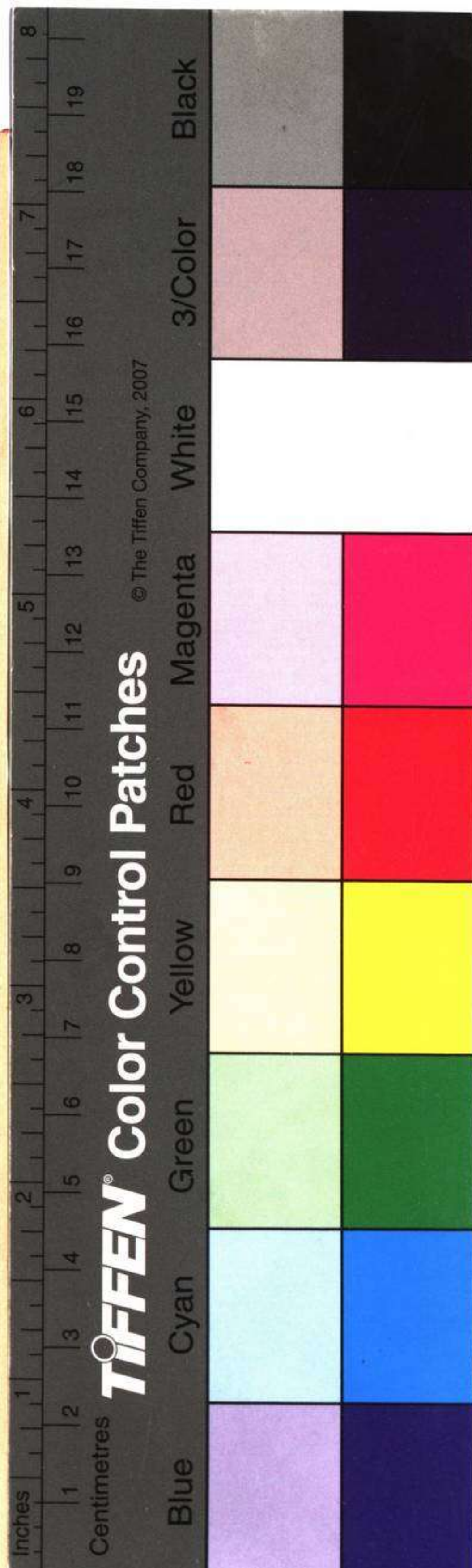
Dr. RUBÉN A. ...

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

Imprenta Madera de GUINART Y PUJOLAR; Bruch, 63, Barcelona

PRÓLOGO

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



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

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

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

implacablemente procediendo de la misma manera!..... La ciencia, á medida que se desarrolla y avanza, es un Minotauro: devora á sus propios hijos.

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

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

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

Abel, Profesor notabilísimo y hábil técnico, ha zanjado la dificultad sacando á luz, cada vez que abre el curso, una nueva edición de su texto, remozado con

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

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

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

R. TURRÓ.

PRÓLOGO

de la undécima edición alemana

A pesar de haber transcurrido tan sólo nueve meses, desde la aparición de la edición décima, ya contiene otra vez la nueva edición del manual, un gran número de correcciones y adiciones, que se han hecho necesarias por los progresos de la investigación. Tanto los capítulos de la parte general, como los especiales referentes á los diferentes microorganismos, han sufrido transformaciones. Los párrafos dedicados á la espiroqueta de la sífilis, á los bacilos del tifus y de la tuberculosis, al vibrión del cólera, á los gonococos, á las amibas y á los parásitos de la malaria, se han completado y ampliado. Han sido introducidos pequeños capítulos nuevos para tratar de los tripanosomas, del espirilo de la fiebre recurrente y de los corpúsculos de Negri que se encuentran en la rabia canina. Hemos eliminado cuidadosamente de nuestro camino, la tentación de adoptar métodos complicados que no pueden enseñarse ni aprenderse en un curso experimental y que no puedan ejecutarse en la práctica, en cualquier parte; puesto que estando dedicado en primer lugar á los estudiantes y tener una extensión limitada, no pue-

de darse cabida naturalmente en este manual, á todos los procedimientos nuevos de investigación, frecuentemente muy difíciles. En todos los nuevos métodos adoptados, se ha consignado el sitio de su publicación, para que en caso necesario, pueda el lector instruirse directamente en el sitio de origen.

Hemos de recomendar á los principiantes, que antes de ejecutar un determinado método de investigación, lean todo el párrafo que al mismo haga referencia, para evitar el cometer faltas, al no tener en cuenta las prescripciones y reglas generales.

En la preparación de la edición undécima, he recurrido á muy valiosos consultores de diversos sitios. He de manifestar en especial mi profundo reconocimiento á los Sres. Dr. Daske, Prof. Dr. Ficker, Consejero privado de Medicina Prof. Dr. Frosch, Dr. Lentz y médico mayor Dr. F. Scholz, por el modo amable con que me comunicaron sus consejos.

Ojalá sea también la undécima edición, de utilidad probada y obtenga amistosa acogida.

Berlín, Junio de 1907.

DR. RUDOLF ABEL

CONTENIDO DE LA OBRA

	<u>Págs.</u>
PRÓLOGO.	V
» DE LA UNDÉCIMA EDICIÓN ALEMANA.	IX
I. <i>El microscopio.</i>	1
II. <i>Esterilización y desinfección.</i>	9
III. <i>Medios de cultivo. Generalidades.</i>	13
IV. <i>Métodos de cultivo. Generalidades.</i>	30
V. <i>Métodos de coloración. Generalidades.</i>	51
VI. <i>Medios de cultivo y métodos de cultivo y coloración especiales.</i>	
para	
El b. del carbunco.	81
El b. tuberculoso.	83
El b. del esmegma.	90
El b. de la lepra.	91
El b. del muermo.	91
El b. del chancro blando.	93
El b. diftérico.	94
El b. de la influenza.	99
El b. tífico (y los paratíficos).	101
El b. de la disentería.	120
El b. coli.	122
El vibrión del cólera.	123
El b. de la peste bubónica.	131
El b. del tétanos.	132

	<u>Págs.</u>
El b. piociano..	133
Los estafilo y estreptococos piógenos.	134
Para los Pneumococos.	135
— meningococos.	136
— gonococos.	137
— actinomicés.	140
— levaduras y aftas.	142
— Mohos y otros hongos.	144
Para los Amibas.	145
— esporozoos de la malaria.	147
— tripanosomas.	148
— espiroquetas de la sífilis.	149
— — de la fiebre recurrente.	151
— corpúsculos de la rabia canina.	151
VII. <i>Modo de recoger el material analizable, del</i> <i>cuerpo animal..</i>	155
VIII. <i>Análisis Bacteriológico del:</i>	
Agua.	158
Aire.	162
Suelo.	163
IX. <i>Inoculaciones y autopsias:</i>	
Inoculaciones.	165
Autopsias	171
X. <i>Métodos de conservación de preparaciones, cul-</i> <i>tivos y órganos animales.</i>	174
ÍNDICE ALFABÉTICO.	179

ABREVIATURAS

- Ann. Past.—Anales del Instituto Pasteur.
Arb. K. G. A.—Trabajos del consejo imperial de sanidad.
Arch. f. Hyg.—Archivos de Higiene.
B. klin. W.—Semanao clínico de Berlin.
Ctrbl. f. Bakt.—Revista de Bacteriología.—(Or.=Tomos originales).
D. m. W.—Revista médica alemana.
Hyg. Rdsch.—Revista de Higiene.
Klin. Jahrb.—Anuario Clínico.
M. M. W.—Semanao médico de Munich.
Veröff. d. K. G. H.—Publicaciones del consejo imperial de sanidad.
Zschr. f. Hyg.—Revista de higiene y enfermedades infecciosas.
-

MEMORIA

El presente documento tiene por objeto dar cuenta de los trabajos realizados durante el año 1909 en el Instituto San Isidro de Madrid, en cumplimiento de lo dispuesto en el artículo 1.º del Real Decreto de 15 de Mayo de 1908.

Los trabajos se han dividido en tres partes: 1.ª, trabajos de índole general; 2.ª, trabajos de índole especial; y 3.ª, trabajos de índole económica.

En la primera parte se han realizado los trabajos siguientes: 1.º, estudio de la situación actual del Instituto; 2.º, estudio de los medios de mejorar la enseñanza; 3.º, estudio de los medios de mejorar el bienestar de los alumnos; 4.º, estudio de los medios de mejorar el bienestar de los profesores.

En la segunda parte se han realizado los trabajos siguientes: 1.º, estudio de la enseñanza de la Historia; 2.º, estudio de la enseñanza de la Geografía; 3.º, estudio de la enseñanza de la Lengua Castellana; 4.º, estudio de la enseñanza de la Literatura; 5.º, estudio de la enseñanza de las Ciencias Exactas; 6.º, estudio de la enseñanza de las Ciencias Naturales; 7.º, estudio de la enseñanza de las Artes y Oficios.

En la tercera parte se han realizado los trabajos siguientes: 1.º, estudio de los gastos del Instituto; 2.º, estudio de los recursos del Instituto; 3.º, estudio de los medios de mejorar el bienestar de los alumnos; 4.º, estudio de los medios de mejorar el bienestar de los profesores.

MANUAL DE TÉCNICA BACTERIOLÓGICA

I

El microscopio

En los trabajos de Bacteriología, se emplean las lentes en seco, para orientarse en las preparaciones microscópicas y para observar las colonias bacterianas. Para el examen de las bacterias en especial, se usan las lentes de inmersión.

Cuando se emplean *lentes de inmersión*, se coloca sobre la superficie limpia (Modo de limpiar, v. pág. 7) del cubreobjetos (los más usados son los de forma cuadrática, de 18 mm. de lado y 0.16 mm. de espesor) mediante una varilla de vidrio, una gota del líquido de inmersión (aceite de cedro espeso, no el empleado para aclarar cortes de tejidos, muy fluido). Se baja el tubo del microscopio, hasta que la lente del objetivo esté en contacto con el líquido de inmersión. Entonces se mira por el microscopio y se baja de nuevo el tubo, moviéndolo con la mano ó mediante el tornillo grande de cremallera, cuando éste existe en el aparato, hasta que se

observe una imagen confusa del objeto, después de lo cual, se busca la posición exacta moviendo con cuidado el tornillo micrométrico.

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

a) Preparaciones sin colorear.—Sirven para el estudio de los microorganismos en vivo y se preparan bajo la forma de las llamadas *gotas suspendidas*.

Mediante una *öse* (1) de platino calcinada, se coloca en el centro de un cubreobjetos perfectamente *limpio* (v. pág. 7) sostenido en el borde de la platina del microscopio ó con una pinza de Cornet, una gota de solución fisiológica (0.75-0.8 %) de NaCl esterilizada (ó también caldo ó agua de peptona, v. págs. 14 y 22), á la que se añade un indicio (no demasiado) del material bacteriano, con una aguja de platino; cuando se trata de observar un líquido poco abundante en bacterias, se pone directamente una gota de éste sobre el cubreobjetos, sin diluirla. Luego se coloca el cubreobjetos invertido, sobre un portaobjetos con una concavidad en cuyos bordes se pone vaselina, de modo que la gota quede libre en el centro de la concavidad. Se comprimen los bordes del cubreobjetos, para que quede sujeto á la vaselina, quedando así la gota en un espacio cerrado herméticamente. En caso de no obtener un cierre perfecto, la evaporación de la gota producirá corrientes que arrastrando las bacterias puedan cambiar fácilmente el movimiento de estas y conservando la preparación largo tiempo, la gota se seca. (Las preparaciones en *gota suspendida* tienen la ventaja sobre

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

las preparaciones ordinarias, extendidas entre el cubre y el portaobjetos, de que la gota encerrada herméticamente en la concavidad, no puede evaporarse y no puede por tanto mojar ni contaminar las manos y los instrumentos.)

Para *observar la gota suspendida*, se coloca esta, usando diafragma estrecho y objetivo de poco aumento, de modo que el borde quede próximamente en el centro del campo de visión. Se substituye luego el objetivo por la lente de inmersión, debiendo quedar el borde de la gota en la misma posición, en el centro del campo visual, suponiendo que las lentes del objetivo están centradas idénticamente, como ocurre siempre, por lo cual puede reconocerse aquél con facilidad. Se pone una gota de aceite de cedro sobre el cubreobjetos (sin mover la preparación) y se toma diafragma más ancho (referencia á éste, v. pág. 5 «Iluminacion»). Luego se baja el tubo del microscopio, hasta que la lente frontal del objetivo esté en contacto con el aceite y se continúa bajando aquél con el mayor cuidado, observando ahora por el microscopio, primero con el tornillo grande y finalmente con el micrométrico, hasta que el borde de la gota aparezca distintamente. Es muy conveniente durante la observación, el mover con la mano el portaobjeto, dándole un ligero movimiento de vaivén; así puede notarse rápidamente si la lente ha descendido demasiado y comprime el cubreobjetos, con peligro de romperlo; además, el borde de la gota (que aparecía como una sombra en la primitiva colocación) se notará mucho más fácilmente, como todo objeto, moviéndolo que estando fijo. Hacia la parte externa del borde de la gota, se observa una especie de malla fina (precipitados debidos al vapor de agua en la cara inferior del cubreobjetos y alrededor de la gota). Los prácticos observan en seguida la gota

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

Esterilizando el cubreobjetos en la llama y preparando la gota con un medio de cultivo transparente, líquido ó hecho líquido, se obtiene un *aparato de cultivo*, en el cual puede observarse mediante el microscopio el desarrollo de las bacterias, pudiendo disponer en caso necesario, de una platina especial que puede calentarse.

Después de hecha la observación, se separa el cubre del portaobjetos, cuidando de que la gota no toque este último y se sumerge aquél en a. sulfúrico ordinario para matar las bacterias. El portaobjetos se puede utilizar para nuevas preparaciones. Al final de las observaciones, se le separa la vaselina mediante

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

b) Para la obtención *de preparaciones coloreadas, de frotos y cortes*, v. págs. 51 y sigs.

Iluminación de la imagen microscópica

En la observación de las gotas suspendidas, se emplea el espejo cóncavo y diafragma estrecho (ó la posición cerrada del diafragma iris) para resolver los contornos y detalles de la imagen. Cuanto más potente es el objetivo, tanto más ancho debe ser el diafragma—próximamente el término medio para la lente de inmersión. El aparato de iluminación (condensador) de Abbé, tiene dispuesto el empleo del diafragma de modo que no sea necesario separarlo de él.

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

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

El foco luminoso artificial más apropiado, es la lámpara eléctrica (empleando peras de cristal mate) ó la luz incandescente de gas. También puede utilizarse una lámpara de petróleo, interponiendo un disco de vidrio azul en el diafragma del microscopio ó haciendo pasar la luz por una esfera de vidrio ó un matraz, lleno de solución de sulfato de cobre amoniacal. (Se añade amoníaco á una solución azul oscura de sulfato de cobre, hasta que la luz de la lámpara de petróleo, que pasa al través de la mezcla, aparezca completamente blanca en el microscopio. La boca del matraz se cierra con un tapón.) Si empleando focos luminosos próximos, la imagen de éstos estorba en la observación de las preparaciones, se usa también el espejo cóncavo para las preparaciones teñidas; ó bien se mueve un poco el aparato de Abbé, hasta colocar exactamente la imagen del foco luminoso.

La llamada iluminación en campo obscuro (disposición especial del microscopio-ultramicroscopia), permite ver iluminados sobre un fondo obscuro, cuerpos pequeñísimos; se emplea, p. ej., para observar la espiroqueta de la sífilis, en vivo.

Modo de limpiar el microscopio

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

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

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

Conservación de las preparaciones

Véase págs. 53, final, 59 y 174.

Modo de limpiar los cubre-objetos

Los nuevos, deben limpiarse con una mezcla de alcohol y éter, \overline{aa} ó con xilol ó bencina y luego con un lienzo fino ó con papel delgado de filtro. Una gotita de

agua colocada en su superficie, debe extenderse regularmente en todas direcciones; si no sucede así se han de repetir los anteriores tratamientos. Facilita muchas veces la limpieza y aún basta por sí solo frecuentemente, el calentar los cobre-objetos, colocados unos junto otros, en una cinta metálica de hojadelata.

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

II

Esterilización y desinfección

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

Hay que atenerse á las siguientes reglas generales:

1. Los objetos más pequeños, como agujas de platino, cuchillas, tijeras, pinzas, varillas de vidrio pueden esterilizarse á la llama. Los objetos de platino se calientan al rojo vivo, los restantes no se calientan al rojo, sólo se pone un par de segundos, por lo menos, en contacto de la llama, la parte que haya tocado material bacteriano. Los instrumentos metálicos se embotan y empañan por la calefacción, por esto es preferible esterilizarlos según los núms. 2-3. Solamente los instrumentos de platiniridio (muy caros) quedan afilados á pesar de enrojecerlos frecuentemente (propios para siembras de cultivos duros y tenaces—actinomyces, hongos—también para sangrías,—v. pág. 153). Las placas de vidrio, tubos de ensayos (hasta que el tapón de guata empieza á ponerse pardo) las cápsulas de vidrio, pipetas, jeringas (cuando ninguna de sus partes puede ser destruída por el fuego), pueden también ser esterilizadas á la llama en caso necesario.

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

3. Los objetos que no pueden soportar el calor seco, pero que no se alteran por la ebullición, se esterilizan al calor húmedo ó sea en corriente de vapor. Tales son los objetos de goma, los líquidos y los medios de cultivo, á excepción de los que contienen albumina coagulable. Para la mayor parte de los casos, basta la permanencia en la corriente de vapor de 100° , de $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora. Los líquidos en grandes cantidades, han de sufrir la acción más prolongada (1 hora) que los en pequeñas cantidades, porque tardan más tiempo en calentarse á 100° . Así pues los matraces de litro, llenos de líquido, han de permanecer más tiempo que los tubos de ensayo. Si los materiales nutritivos contienen esporas aptas para reproducirse, se siguen dos procedimientos para la esterilización; se les somete tres días consecutivos á la acción del vapor durante $\frac{1}{4}$ -1 hora y en los períodos intermedios se mantienen á unos 20° ó también á 37° , (se espera á que las esporas germinen y así, las formas vegetativas resultantes pueden matarse por la calefacción siguiente) ó bien se esteriliza en la autoclave á temperaturas hasta 130° y las correspondientes presiones, (tiene la ventaja de que no deben emplearse varios días en la esterilización completa, sin embargo no puede emplearse en la gelatina, p. ej., por perjudicarla en su punto de solidificación, para la leche porque toma color pardo). Una temperatura de 120° , debe ac-

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

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

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

a) Recogerlos estériles (véase suero sanguíneo, página 22).

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

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

Véase más adelante lo referente á la esterilización del suero y análogos, pág. 23 y siguientes.

5. Un lavado ó enjuague en sol. de sublimado al 5 ‰ y luego en alcohol y éter \overline{aa} , constituye un procedimiento de esterilización aplicable á muchos objetos

(p. ej. objetos de goma), aunque positivamente, no tiene por sí solo influencia segura. Cuando conviene, se queman en la llama los últimos restos de alcohol-éter.

6. Cuando se trata únicamente de matar las bacterias, p. ej., para desinfectar los tubos de ensayo usados, se emplea preferentemente una solución de sublimado al 1 : 1000, adicionada de 1 % de HCl ó NaCl. Las vasijas destinadas á cultivos, usadas, pueden librarse de gérmenes patógenos vivos, hirviéndolas durante 1-2 horas, en una olla con agua ó en corriente de vapor. Las *manos contaminadas* de bacterias, se limpian lavándolas perfectamente con solución de sublimado al 1:1000 ó con ácido fénico al 1 : 100. Se lavan luego con agua, jabón y cepillo; otra vez con solución desinfectante reciente y otra vez con agua. N. B. La primer agua de loción y aún el cepillo, pueden en ciertos casos contener aún gérmenes, por esto conviene la nueva desinfección. —Neutralización ó destrucción de los cadáveres de animales, v. pág. 173 al final.

III

Los medios de cultivo.—Generalidades

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

Agua de carne

1. 500 gr. de carne de ternera ó de caballo, cortada en pequeños pedazos y desprovista de grasa, se pone en maceración durante $\frac{1}{2}$ hora, en una cazuela metálica, con 1 litro de agua caliente á 50° y luego se hierve de $\frac{1}{2}$ á $\frac{3}{4}$ de hora (véase además pág. 17, epígrafe 1).

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

Con esta agua de carne se preparan: el caldo, la gelatina y el agar. En caso de que quiera conservarse, debe ser hervido durante tres días consecutivos, en corriente de vapor, durante $\frac{1}{2}$ hora ó bien una sola vez en la autoclave á 120° y durante 15 minutos.

Caldo

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

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

3. Neutralizar con solución acuosa saturada (también puede usarse al 10 % ó normal) de carbonato sódico (ó también de fosfato sódico ácido) ó lejía de NaOH al 25 %. El final de la reacción se reconoce, en que el papel de tornasol azul, no se enrojece en contacto del caldo (debe humedecerse el papel con una gota de agua ordinaria para comparar); el papel rojo se volverá azul. Cuando se ha añadido demasiado álcali, se vierte gota á gota ácido fosfórico (ó también láctico ó clorhídrico). Un pequeño exceso de álcali (Na_2CO_3 , no NaOH) casi no perjudica (véase gelatina, pág. 16, final).

Neutralizar empleando como indicador la fenolftaleína v. pág. 19, 3.

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

5. Filtrar.—Ensayar nuevamente la reacción del líquido filtrado, corregirla en caso necesario, nueva

ebullición y filtración.—En caso de que el líquido filtrado, después de frío, no aparezca transparente, se filtra otra vez ó se aclara como la gelatina; véase más abajo.

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

Gelatina

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

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

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

mente ó durante más tiempo. En la gelatina preparada cuidadosamente como antes se ha dicho, es algo más bajo que en la que se guarda solidificada 24 horas ó más.

Gelatina especial con punto de fusión elevado

Preparada según Forster

Se disuelven 100-150 gr. de gelatina (en el comercio se encuentra en especial gelatina «dura») en 1 litro de caldo estéril y calentado á 60° (en una pequeña caldera). Se añade KOH, hasta que quede ligera reacción ácida y luego se alcaliniza débilmente con Na₂CO₃. Luego se añade una clara de huevo. Se coloca la caldera dentro de una marmita grande con agua hirviendo, y se revuelve bien la gelatina; esta se calienta á 98-99° en unos 3 minutos. Luego se hace hervir la marmita junto con la gelatina, convenientemente tapada, durante unos 15 minutos. Se filtra en caliente, por un embudo calentado con agua á 60°, el cual se ha esterilizado previamente junto con el filtro, el matraz colector y el aparato para la distribución. Se recoge toda la gelatina en un matraz. Se distribuye, después de esterilizada, en tubos estériles que se calientan durante 20 minutos en corriente de vapor. Se enfría rápidamente sumergiéndolos en agua fría. La gelatina queda así estéril y dispuesta para el uso; su punto de fusión oscila, después de conservarla varios días, entre 29-30°, antes es algo más bajo. (La parte esencial de la preparación es el tiempo que se hace hervir; véase más arriba.)

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

ción normal de Na_2CO_3 , por litro de gelatina, después de neutralizada ésta, no es casi nunca perjudicial. Ciertas bacterias, exigen una alcalinidad mayor (véase más adelante)—10 cc. de solución normal de Na_2CO_3 equivalen á 5,3 cc. de solución al 10 % de Na_2CO_3 anhidro, ó á 14,3 cc. de solución al 10 % de Na_2CO_3 cristalizado. Una solución al 10 % de Na_2CO_3 cristalizado, contiene 3,7 % Na_2CO_3 , la solución normal 5,3 %.

Agar

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

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

Se ensaya la reacción, corrigiéndola si es necesario.

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

rior transparente del todo y aclarándola otra vez por sedimentación, si es conveniente (da buenos resultados, el empleo de campanas de pie, altas y estrechas ó de copas; se puede dejar solidificar el agar en ellas, extraerlo luego dando golpes y separar la parte turbia, cortándola).

6. Como en el caldo (pág. 15.)

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

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

1. El *agua de carne*, puede emplearse para preparar medios de cultivo, *diluida unas cuatro veces*, sin que su poder nutritivo se altere.—El agua puede prepararse con otras carnes, además de la de vaca y caballo, también se prepara con placentas, con genitales de toro (muy apropiado) y análogos.

2. En lugar del agua de carne, puede emplearse también una solución al 1-2 % de extracto de carne Liebig. (Es innecesaria la adición de sal común). Los medios de cultivo preparados con esta solución, no tienen el mismo valor que los preparados con agua de carne. *Para análisis de aguas*, se empleará oficialmente la gelatina siguiente: Se disuelven 2 partes de extracto de carne Liebig, 2 de peptona Witte y 1 de NaCl en 200 de agua. Se calienta el conjunto durante 1/2 hora en la autoclave y se filtra después de frío. A 900 partes de

esta solución, se les añaden 100 partes de gelatina, se hierve el conjunto durante media hora, después que la gelatina se haya hinchado y macerado. A la solución caliente se le añaden 30 partes de NaOH al 4 % y luego se le añade gota á gota la misma NaOH, hasta que el papel azul de tornasol no se enrojezca ya. Se calienta $\frac{1}{4}$ de hora en corriente de vapor; se ensaya la reacción y se corrige en caso necesario. Se le añade 1 $\frac{1}{2}$ partes de carbonato sódico cristalizado, no eflorescido, se hierve $\frac{1}{2}$ y $\frac{3}{4}$ hora y se filtra. Se distribuye en tubos de ensayo estériles, unos 10 c. c. en cada uno, (véase pág. 20) se esterilizan en autoclave durante 15-20 minutos.

3. La neutralización es difícil cuando se emplea como indicador el tornasol (pág. 14) porque no se distingue bien el momento en que el papel azul deja de enrojecerse. Más exacta, aunque de uso más limitado, es la *neutralización*, empleando *fenolftaleina* como *indicador*. Se diluyen 5^{cc} del medio de cultivo en 45^{cc} de agua destilada reciente, en un matraz, y se hierve directamente sobre la llama, unos 3 min. se le añade luego 1^{cc} de fenolftaleina (sol. 0,5 gr. en 100^{cc} de alcohol de 50 %) y se valora con solución $\frac{N}{10}$ de NaOH ó de HCl, hasta obtener un líquido de color rosado característico. Luego se añade á todo el medio de cultivo NaOH ó HCl normales, en proporción á los resultados de la valoración y hasta obtener una reacción neutra. Se ensaya de nuevo una porción del medio de cultivo, (5^{cc}) como antes y se corrige, en caso necesario, la reacción del conjunto. Se hierve este y se ensaya de nuevo. Cuando el medio de cultivo dá reacción neutra ó ligeramente alcalina con la fenolftaleina, resulta fuertemente alcalina para el tornasol, puesto que las peptonas y difosfatos existentes en la solución nutritiva, reaccionan neutro ó alcalino con el tornasol y son ácidos ó

neutros con relación á la fenolftaleina. Así á los medios de cultivo de reacción neutra ó ligeramente alcalina con el tornasol, que son las mas convenientes para el desarrollo de las bacterias, debe añadirseles ácido todavía para que queden neutros á la fenolftaleina. Se añade 1, 5 % (hasta 2, 5, % y anotando cuanto) de HCl normal se hierve, filtra, esteriliza, etc.

4. La adición de 2-8 % de glicerina puris., á los medios de cultivo, antes de la esterilización (especialmente el agar, el llamado *agar glicerinado*) aumenta su utilidad para muchos fines (véase pág. 83 bacilo tuberculosis).

Distribución y esterilización de los medios de cultivo

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

Para la distribución, se dispone un embudo enlazado con un tubo de goma, provisto en su extremo opuesto

de un tubo de vidrio, se tapa el embudo con una cápsula de cristal y se esteriliza todo junto al calor húmedo. Por medio de este aparato, en cuyo tubo de goma se pone una pinza de Mohr, se vierten 5^{cc} de *substrato* en cada tubo. Con esta disposición se consigue que al llenar los tubos no se manchen las paredes ni el borde superior de los mismos, no pegándose por tanto el tapón de algodón.

Para distribuir cantidades conocidas en los tubos de ensayo, se emplean embudos especiales (de Treskow) ó bien se dispone una bureta graduada, unida por medio de un tubo de goma con un tubo de vidrio adicional, en forma de **Λ** ó de **└**, una de cuyas ramas unida por un tubo de goma á un matraz colocado en alto, da paso al medio de cultivo, hasta que llegue al 0 de la bureta, cerrando entonces el paso por una pinza y verificando la distribución por la otra rama provista de tubo de goma, tubo de vidrio y pinza de Mohr, en cantidades conocidas. (Antes de esterilizar los tubos, se hace en algunos de ellos una señal con lápiz graso en el punto donde alcanzó el contenido, para observar si cambiaba de volumen por la esterilización).

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

Agua de peptona

En lugar de caldo, puede emplearse muchas veces una solución de 1-2 % de peptona (Witte-Rostock) y $\frac{1}{2}$ —1 % de NaCl en agua destilada (ó común). Para ciertos fines (reacción del indol pág. 47) añádesele además 0,01 % de KNO_2 y 0,02 % de Na_2CO_3 cristalizado. Esterilización como en el agua de carne (es excelente para el cólera y otros vibriones parecidos, mediano para los bacilos coli y Eberth y malo para el b. diftérico). Para investigar ciertas especies en las aguas, véase pág. 127, conviene tener preparada solución de peptona concentrada y estéril, guardada en matraces. (Peptona y NaCl $\overline{\text{aa}}$ 10,0, KNO_2 0,5, $\text{Na}_2 \text{CO}_3$ cristalizado 0,2, agua 100.0)

Medios á base de suero sanguíneo

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

Por una calefacción prolongada á 70°, se transforma el suero en una masa sólida y bastante transparente, en la cual se separa algo de «agua de condensación»; es preferible mantener los tubos en posición inclinada, en aparatos especiales para coagular suero.

El suero así obtenido, contiene casi siempre gérmenes muy resistentes. Para obtener tubos de suero libres de gérmenes, se puede emplear la esterilización fraccionada (v. pág. 11, apart. 4 b) aunque este procedimiento no es completamente seguro. O bien, se colocan en una estufa 24 horas y se separan aquellos en que háy germinación (enturbiamiento del «agua de condensación,» frecuentemente en el 50% y más). O se distribuye el suero en frascos de medicamentos, se le añade 1-2% de cloroformo y se cierra con tapón de goma; después de conservarlos algunos meses de este modo (conviene tener provisión de ellos) quedan la mayor parte exentos de gérmenes (el cloroformo se expulsa por el calor). La filtración para separar los gérmenes, es muy lenta y circunstancial en el suero (v. pág. 11, núm. 4 c.) Lo más seguro, es recoger la sangre estéril, sangrando asepticamente en el mismo laboratorio un carnero ó becerro, en la carótida, colocando una cánula estéril en la herida y conduciendo la sangre á un matraz estéril, por medio de un tubo de goma también estéril, unido á la cánula y operando luego como antes se ha dicho. Cuando el suero se utiliza líquido como medio de cultivo, este es el procedimiento mejor.

Para muchos fines, puede renunciarse á obtener un suero coagulado, transparente del todo, ya que lo es poco en la mayor parte de los casos, pudiendo ser esterilizado, después de coagulado en posición inclinada, calentándolo á 95-98° durante tres días, 1/2 hora cada día, en un aparato de coagular suero (ó también al

calor húmedo á 100°, con lo cual no obstante, la superficie del medio se hace desigual por la formación de burbujas.) Como precaución, pueden tenerse los tubos durante 24 horas á 37°, y separar los germinados (enturbiamiento del agua de condensacion) antes de usarlos.

En lugar de los tubos de ensayo, se puede coagular el suero en cápsulas de vidrio dobles (las llamadas de Petri v. pág. 31) y esterilizar como antes. En este caso, se seca la superficie rápidamente y también son frecuentes los gérmenes extraños. Del mismo modo que el suero, puede emplearse como medio de cultivo, coagulados ó líquidos, los *líquidos ascítico* y *el de hidrocele*, obtenido por punción aséptica. (Reacciones muchas veces muy fuertemente alcalinas, ensayarlas siempre!)

Suero sanguíneo adicionado con caldo

(Suero de Löffler)

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

Suero humano

Véase al tratar de los gonococos, nr. 1 y 2.

Agar-suero

El suero sanguíneo líquido y estéril, calentado á 40-50°, se mezcla $\frac{1}{a}$ ó al 1: 2 con agar (que contenga 2 ó 3%)

de agar-agar) líquido y enfriado á 40-50°. La mezcla se coagula por enfriamiento. Antes de la coagulación, se siembra y luego se extiende en (págs. 30-32) placas ó se coloca en tubos inclinados ó en capsulitas, para la coagulación y luego se siembra en la superficie (pág. 36); del mismo modo se prepara el *Ascites-Agar* y el *Hidrocele-Agar* (véase también pág. 138 núm. 3.)

Huevos

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

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

Patatas

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

Se toman patatas de buena calidad, se lavan convenientemente con una escobilla, en el chorro de agua. Luego se separan los llamados ojos y las manchas podridas, con un cuchillo y se ponen las patatas en solución de sublimado al 1 % durante 1/2 hora. Se lavan

con agua, se cuecen $\frac{3}{4}$ de hora en autoclave abierta, se cogen con las manos limpias y mediante un cuchillo estéril, se cortan en dirección al diámetro mayor, se separan las porciones resultantes y se colocan en la cámara húmeda (grandes cápsulas dobles, en cuyo fondo se ponen papel de filtro humedecido con agua) guardándolos de modo, que no estén en contacto unas con otras. Se sembrará en el centro de la superficie.

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

2. *Patatas mondadas y en discos ó rodajas* (v. Esmarch)

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

3. *Patatas mondadas, en cuña* (Bolton, Globig.)

Un perfora corchos ancho, se introduce en dirección á su eje mayor en la patata limpia, obteniendo así después de separar la porción externa, un cilindro, que se secciona longitudinalmente con un cuchillo estéril, en dos cuñas. Cada cuña se coloca con la base hacia arriba, en un tubo de ensayo, estéril, en cuyo fondo hay un poco de algodón ó un pedazo de tubo de vidrio, que evita que el fragmento de patata, esté en contacto con el agua que se separa de la misma por la cocción. Esterilización como en el núm. 2.

4. *Pulpa de patata.*

Las patatas cocidas, se machacan con agua ó leche hasta obtener pulpa, que se distribuye en capas de 1cm

de altura, en matraces Erlenmeyer y se esterilizan al calor húmedo.

Las patatas tienen reacción ácida. Para muchas bacterias que son sensibles á los medios de cultivo ácidos, se aumentará el poder nutritivo de la patata, hirviéndolas con solución de NaCl al 3% ó de Na₂CO₃ al 1% y separándolas luego cuidadosamente. *Patatas glicerinadas* v. pág. 83.

Pan

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

Leche

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

Soluciones nutritivas sin albúmina,

Según Uschinsky C. Fränkel.

Se disuelven 5,0 de NaCl, 9,0 de fosfato sódico ó potásico, asparragina ó asparraginato sódico 4,0 y lactato amónico 6,0 en 1000 de agua común, se alcaliniza ligeramente con NaOH y se esteriliza como el caldo.

Otros medios de cultivo

Véase capítulo VI y el índice.

Conservación de los medios de cultivo

Regla general: En todos los medios de cultivo que se quieran conservar, debe anotarse en el depósito, el día en que se acabaron de preparar, la composición, y la reacción.

Los medios de cultivo se echan á perder muchas veces al guardarlos, particularmente por desecación y porque á pesar de cerrar bien el tapón de guata, entran mucedineas. Pueden evitarse ambas cosas: ó quemando el extremo abierto del tubo ó matraz y la parte externa del tapón de guata, y colocando encima un dedal de goma que ajuste perfectamente y que se calienta en corriente de vapor (también con papel de estaño esterilizado ó con una capa de metal fusible, véase pág. 175

número 4); ó bien, se guardan las vasijas que contienen los medios de cultivo, dentro de cajas de hojalata (bote de Cake), con tapa que ajuste perfectamente y en los que se coloca además un pedazo grande de papel de filtro ó de guata, humedecido en esencia de clavo.

A los medios de cultivo que se han secado, se les añade el agua que se ha evaporado y se esterilizan de nuevo (debe mezclarse bien). Los medios de cultivo que empiezan á enmohecerse, pueden aprovecharse aún, repitiendo las esterilizaciones.

IV

Métodos de cultivo. Generalidades.

Procedimiento de las placas.

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

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

tubo, inclinándolo y poniéndolo de nuevo vertical (no debe agitarse nunca, pues las burbujas que se formarían, constituyen luego colonias aparentes. La gelatina no debe tocar el tapón de guata!)

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

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

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

Mejor que las placas de vidrio, son las llamadas cápsulas de Petri (dobles de 9-10 cm. de diámetro en la cara plana) que pueden llenarse sin aparato repartidor (levantando un poco uno de los bordes de la cubierta, para verter el medio, de cultivo), que no se contaminan

tan fácilmente por los gérmenes del aire y no dejan escurrir la parte del medio, licuado por el crecimiento de bacterias, como sucede en las placas sencillas.

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

Deben etiquetarse en seguida todos los cultivos, con lápiz para vidrio ó con etiquetas, consignando clara y exactamente la fecha de la siembra y la procedencia.

2. *Placas de agar*: Se preparan igual que las de gelatina, con tubos de agar fundido y enfriado á 40° próximamente, (sólo pueden emplearse cápsulas de Petri, porque el agar no quedaría compactamente pegado en las placas de vidrio, por la pérdida de agua de condensación. Debe operarse rápidamente, porque el agar se solidifica con facilidad (v. pág. 18.) Las placas deben calentarse ligeramente, antes de verter en ellas el agar. Los tubos extendidos salen mal. Las placas de agar, se guardan con la tapa hacia abajo, porque de este modo el agua de condensación que se separa, va á parar de nuevo toda ella, con facilidad, á la superficie del medio de cultivo donde se desarrollan las colonias.

Para la preparación de placas de *agar-suero*, véase página 24.

Ventajas de la gelatina: La mayor parte de las

colonias, se desarrollan en ella con formas características.

Inconvenientes de la gelatina: Permanece sólida á lo más, hasta los 30° (la preparada del modo usual sólo hasta 22°-24°, particularmente en placas) y no á la temperatura del cuerpo humano. Se licua fácilmente (peptonización) por muchas bacterias, dificultando el aislamiento en las placas.

Ventajas del agar: Permanece sólido á la temperatura del cuerpo humano, empleada en los cultivos. No se licua por el desarrollo de las bacterias, pudiendo ser conservadas las placas mucho más tiempo que las de gelatina.

Inconvenientes del agar: Las colonias crecen en él, á menudo, en formas muy poco características.

Diluciones con empleo de poca gelatina ó agar: Se pone un cierto número de gotas de caldo ó de gelatina, sobre una placa estéril ó sobre la tapa de una cápsula Petri, se siembra la primera con el material analizado, de ésta la segunda, de ésta la tercera, etc., y de las gotas así preparadas uno ó varios tubos de gelatina ó de agar que se vierten luego en placas.

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

Para tomar semilla de una colonia determinada, se efectúan las llamadas *picaduras*: Se coloca la colonia desarrollada en la placa y que se observa con poco aumento, se toca por debajo del objetivo con una aguja de platino fina, corta y doblada convenientemente en su punta, de modo que no esté en contacto

con las piezas del microscopio, ni con el aparato del cultivo, ni con el medio, para lo cual se apoya el dedo meñique de la mano que sostiene la aguja, sobre la platina del microscopio, y se pica en la colonia con la punta de la aguja, perceptible en el campo de visión, observando esta operación al microscopio. Luego se separa de nuevo la aguja con igual cuidado. El material tomado de la colonia, se utiliza para obtener preparaciones ó cultivos puros.

Para orientarse en las observaciones, se disponen las *preparaciones por compresión*: Se coloca sobre el sitio de la placa observado, un cubre-objetos esterilizado á la llama y dejado enfriar, se comprime fuertemente y se separa luego mediante una pinza, tratándolo luego según alguno de los métodos de coloración descritos más adelante, v. pág. 51. Para orientarse en general sobre las clases de colonias existentes, ó para observar colonias superficiales muy pequeñas y que no pueden picarse, se emplea este método.—Del sitio de la placa donde se hace una preparación *por compresión*, no debe tomarse ya material para obtener cultivos, porque al aplastar las colonias sencillas, pueden haberse mezclado unas con otras.

Modo de contar los gérmenes (v. págs. 160 y 169.)

Preparación y resiembra de los cultivos puros

Preparación de los cultivos en placas: Se toma por picadura (véase pág. 33) un poco de materia de una colonia aislada, con la aguja de platino y con ella se siembra el medio nutritivo, contenido en tubos de ensayo. En los medios de cultivo líquidos, se introduce la aguja varias veces. En los medios sólidos no

transparentes, se hace en la superficie, una estría longitudinal ó una serie de estrías en varios sentidos; en los tubos que contienen el medio de cultivo transparente, solidificado en posición inclinada, se procede lo mismo (*siembra en estría.*) Cuidado en romper la superficie! Si se introduce la aguja en el medio de cultivo solidificado, estando el tubo en posición vertical, obtendremos una *siembra por picadura*. Si se quiere observar al microscopio, el desarrollo del cultivo por picadura (con pequeño aumento), se hace la picadura junto á la pared del tubo, en lugar de hacerlo en el centro.

Resiembra de cultivos, se efectúa pasando una pequeña cantidad materia, con la öse ó con la aguja de platino enrojecida y dejada enfriar, á un nuevo tubo con medio nutritivo. La posición de los tubos, ha de ser la misma que se adopta en las diluciones (v. pág. 30) ó bien (sólo en los tubos de gelatina), con la boca hacia abajo.

Para conservar los cultivos bacterianos, basta en general pasarlos cada 4-6 semanas á nuevos medios de cultivo, aunque muchas especies, particularmente las patógenas, necesitan pasos más frecuentes (p. ej. b. influenza, gonococos, pneumococos). — Las bacterias conservan su vitalidad durante muchos meses, si se empapan cortas hebras de seda (seda Turner 4) en cultivos de aquellas, ó (mejor aún) en sangre ú otros líquidos albuminosos, en los que estén contenidas, se desecan dichas hebras puestas en capsulitas estériles, en un desecador sobre CaCl_2 y luego se guardan en tubos de ensayo pequeños, colocados en el interior de otros mayores, en cuyo fondo hay CaCl_2 y cerrados por algodón y un dedal de goma.

Substitución del procedimiento en placas por siembras fraccionadas

En lugar de repartir la materia que contiene bacterias, en el medio de cultivo y verter éste luego en placas, dejando fijar los gérmenes al solidificarse el medio, se puede proceder al aislamiento de los mismos, haciendo estrías con el material bacteriano en la superficie del medio de cultivo, solidificado en placas ó en tubos inclinados. Se procede tomando con una öse, un pincelito de platino calcinado (éste araña fácilmente la superficie al sembrar) ó con un poco de algodón esteril, la materia que se quiere sembrar y se pasa por toda la superficie del medio. En la mayor parte de los casos, por la gran superficie que presentan las placas, basta sembrar una sola para obtener colonias aisladas, á no ser que se haya tomado mucha materia ó que ésta sea muy rica en bacterias. (Cuando se siembra con la öse, se pica con la materia que la misma contiene, un punto de la superficie del medio de cultivo y se extiende con la anilla formada por el hilo de platino por toda la cara superficial; también puede utilizarse para la repartición en las placas, una varilla de vidrio doblada en ángulo recto.) Los tubos solidificados en posición inclinada, se deben sembrar generalmente uno después de otro. Si se ha separado del medio de cultivo, agua de condensación, esta misma puede servir para hacer las diluciones. En los tubos de suero p. ej. se introduce la öse cargada de material en el agua de condensación de un tubo, se enjuaga en ella y después se pasa por la superficie del suero y luego rápidamente con la misma öse y sin tocar material de nuevo, se

siembran otros 2 ó 3 tubos. En los 2 ó 3 tubos se desarrollan, en la mayor parte de los casos, colonias aisladas, con las cuales se pueden sembrar cultivos puros. En los medios de cultivos, que no pueden pasar fácilmente del estado sólido al líquido y viceversa (así, p. ej. suero sanguíneo coagulado, patatas) este método, es el único que puede emplearse para el aislamiento de los gérmenes.

El cuerpo animal como medio para obtener cultivos puros

Muchos organismos patógenos, pueden aislarse en una mezcla de bacterias, por intermedio de un cuerpo animal. Para ello es necesario, que con el microorganismo inoculado en los órganos internos del animal, no vayan mezclados otros gérmenes patógenos para aquél. Por medio de la inoculación (técnica pág. 165) se difunde una sola especie de microorganismos patógenos, la cual puede ser recogida completamente pura, en los órganos internos del animal, después de muerto éste. (Se emplea p. ej. para aislar el b. anthracis, b. de la septicemia de las ratas, b. tuberculoso, b. del muermo, los pneumococos.) Para hacer siembras de los cadáveres, es preferible preparar primero cultivos en placas y luego á partir de éstas, los cultivos puros. Si se quieren obtener en seguida cultivos puros, se hacen las siembras no por picadura sino por estría, en las cuales, se pueden observar más fácilmente las colonias extrañas que puede haber y nunca sembrar en medios líquidos, porque en ellos es difícil á menudo reconocer las contaminaciones.

Cultivos en gota suspendida de caldo, gelatina etc.

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

Cultivos de los anaerobios

A los medios de cultivo, destinados á los anaerobios, es práctico añadirles 1-2 % de glucosa ó también 0,3-0,5 % de formiato sódico ó 0,1 % de sulfoíndigotato sódico (de color azul, se decolora por el desarrollo de bacterias, generalmente por reducción—v. página 46 Nr. 4.—)

Muchos anaerobios son esporígenos. Se analiza al microscopio la materia de la que deben aislarse; si se encuentran anaerobios (que se reconocen por sus formas la mayor parte) esporulados, se pueden destruir numerosas formas concurrentes de anaerobios facultativos, que no quieran reproducirse, calentando el material que ha de sembrarse, durante media hora, á 55-70°, con lo cual no se perjudica á los anaerobios obligados y así pueden obtenerse en seguida cultivos puros de estos, en caso necesario. Sin embargo, deben hacerse siempre siembras con materia antes de calentarla.

De los numerosos métodos de cultivo se recomiendan los siguientes:

1. Siembras sin separación del aire

(Tarozzi, Wrgosek, C. B. I. Tom. 38. Pág. 619, 43. Pág. 17): Se ponen en caldo, fragmentos de hígado, bazo ó riñón de un animal, huevos cocidos ó patatas,

no muy pequeños, aproximadamente de 1 gr. por cada 10 c. c. de caldo. Se esterilizan en la autoclave á 120°, y se siembran lo más pronto posible, después de esterilizados.

2. Métodos por separación mecánica del oxígeno:

a) *Cultivos en capas profundas.* Se llenan tubos de ensayo hasta $\frac{1}{4}$, con gelatina ó agar, se hierven convenientemente, se enfrían rápidamente con agua fría, sin agitar y se siembran. Para un aislamiento apropiado, se introduce el material de siembra en el medio todavía líquido, en el que no se ha introducido aire por agitación, se reparte bien y se hacen diluciones como en el procedimiento de las placas, sembrando en otros 2-3 tubos más. Después de solidificados aquéllos, viértese cuidadosamente (después de quemar la boca de los tubos) el contenido de un segundo y tercer tubos, fundido y caliente á lo más á 40° (aún en los cultivos en gelatina es preferible verter encima, no gelatina sinó agar). Para la observación y aislamiento de las colonias desarrolladas, se rompen los tubos y se corta el medio en el sitio deseado, por medio de un cuchillo esterilizado, ó bien se siembra de una colonia aislada sin romper el tubo, tomando materia con una aguja larga ó con un capilar fino, obtenido con tubo de cristal estirado á la lámpara.

Para la resiembra de cultivos puros, se disponen cultivos por picadura (picadura que alcance hasta las capas mas profundas) en tubos llenos hasta $\frac{3}{4}$ de medio de cultivo, y hervidos recientemente.

También puede echarse en la superficie, aceite estéril, para evitar la entrada del aire expulsado por la ebullición del medio de cultivo. Muchos anaerobios se desarrollan, bajo una capa de 3^{cm} de aceite, parafina

líquida ó vaselina, en medios de cultivo líquidos hervidos recientemente. (Son métodos poco limpios, porque se descompone la grasa por contaminación)—Modificaciones ulteriores v. Ghon y Sachs, *Centrbl. f. Bakt. Abt. I. Or.* 32. pág. 403.

Los anaerobios pueden desarrollarse bien asimismo, en la rama cerrada de un tubo de fermentación, (v. página 44) así como sus otras vasijas para fermentaciones (v. pág. 44 párraf. 3 al final).

b) *Absorción del aire por medio de una bomba aspirante* (Gruber). Los tubos sembrados se colocan en baño de agua á 30-35° (los de agar á 42°). El tapón de goma parafinado que cierra los tubos, está provisto de un tubo de vidrio que ajuste bien y que termina en la superficie inferior del tapón; este tubo está enlazado con una bomba aspirante. El medio de cultivo se lleva á la ebullición en un espacio con aire enrarecido, al cabo de un $\frac{1}{4}$ de hora, ha sido arrastrado todo el aire, cerrando entonces el tubo de enlace, fundiendo á la lámpara un estrangulamiento de que está provisto. La gelatina puede repartirse finalmente como en los tubos rodados (v. pág. 32).—El método combinado con 3, véase además Emmerling. *Hyg. Bdsch.* 1904. pág. 452.

3. Métodos con absorción del oxígeno (Buchner):

Se colocan los tubos ó cápsulas sembrados (éstas últimas abiertas y colocadas unas sobre otras, sostenidas por varillas de vidrio) en una vasija de vidrio que cierre herméticamente (p. ej. en un tubo ancho, cerrado con tapón de goma parafinado, ó en un desecador.) En el fondo de esta ó en una capsulita, se coloca solución de ácido pirogálico y en el último instante antes de cerrar la vasija se le añade con una pipeta, lejía de potasa. La solución alcalina de ácido pirogálico ab-

sorve el oxígeno. Se calcula, según *Buchner*, como necesario para 100^{cc} de aire, 1 gr. de ácido pirogálico (disuelto en 2-3^{cc} de agua) y 10^{cc} de solución potásica formada por 1 de KOH al 15 % y 10 de agua; ó según *Hammerl*, 2 gr. de ácido pirogálico disuelto en 1,5^{cc} de KOH. al 50%. Para la completa absorción del O se necesitan 24 horas, á la temperatura de la estufa; si se añade la solución de potasa caliente, se verifica más rápidamente la absorción. Cápsulas preparadas para la absorción del O. v. *Schüler*. *Contrbl. f. Bakt. Abt. I.* Or. 37 pág. 298 y *Dreuw*, id. 36 pág. 748; Absorción con el fósforo v. *Sellards*, idem n.º 37 pág. 632.

4. Métodos de desalojamiento del oxígeno por el hidrógeno

a) *Por una corriente de hidrógeno (Fränkel-Hueppe.)* Se cierra el matraz ó tubo que contiene el medio de cultivo sembrado, mediante un tapón de goma biperforado y provisto, en uno de los orificios, de un tubo de vidrio doblado en ángulo recto, que penetre profundamente en el líquido nutritivo y en el otro orificio, de un tubo también doblado y que no sobresalga de la cara inferior del tapón (disposición igual á la del frasco lavador!) Por el primer tubo se conduce una corriente de H, producido en un aparato de Kipp. y lavado en solución de IK y en solución de ácido pirogálico + KHO, hasta que encendiendo el gas que sale por el extremo del otro tubo, estirado en punta capilar, arde con pequeña llama tranquila. Luego se cerrará por fusión el extremo afilado del tubo, mientras pasa la corriente. El tapón de goma puede recubrirse convenientemente con parafina fundida, para cerrarlo herméticamente al aire. Si la vasija de cultivo contiene gelatina, esta puede repartirse después de pasar la corriente de H. como en los tubos rodados (v. pág. 32).

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

Modificación del método para cultivos en cápsulas (Blücher.) En una cápsula de vidrio bastante grande, que contiene una capa de solución de a. pirogálico de 1^{cm} de altura, se coloca en el centro y sostenido por un soporte de alambre, la cápsula conteniendo el agar ó gelatina sembrados, abierta. Se coloca encima de la cápsula un embudo invertido, de modo que su borde quede sumergido al rededor, en la sol. de a. pirogálico y se le mantiene fijo mediante un poco de plomo. Por el tubo del embudo se conduce H, que expulsará el aire por debajo el borde de aquél. Después de una corriente prolongada, se cierra el tubo de goma que dá paso al gas, por encima del tubo del embudo, mediante una pinza de tornillo, cortase la goma junto á la pinza y se llena la porción de tubo que sobresale con parafina líquida. Finalmente se añade más KOH y solución de ácido pirogálico por medio de una pipeta y se vierte parafina líquida entre la cápsula grande y el borde del embudo— Grandes aparatos parecidos, para muchos cultivos, de *Botkin* (Zschr. f. Hyg. Tom. 9) y *Nowy* (Ctrbl. f. Bakt 16).

b) *Por introducción de Hidrógeno* (Fuchs) Los tubos de cultivo, sembrados, se fijan en un sosten con la boca hacia abajo (en el agar y suero debe separarse

previamente el agua de condensación) y se abren. Se conduce durante algunos minutos gas hidrógeno, mediante un tubo unido al aparato productor de gas, y que se introduce hasta la cúpula del tubo, poco á poco se baja hacia la boca del mismo y se cierra éste luego rápidamente, estando en la misma posición, mediante tapón de goma esterilizado que ajuste bien, para lo cual, se sumerge el borde del tubo de cultivo, en parafina líquida. Se coge el tubo por la parte parafinada y se guarda apoyado sobre el tapón. Cuando se emplea este método para tubos de agar inclinados, se escoge un agar algo más concentrado, no reciente y que contenga $\frac{1}{2}$ % de goma arábica, con lo cual el medio de cultivo no resbala poco á poco hacia el tapón, ni se apelotona sobre éste.—El procedimiento puede servir para siembras fraccionadas de anaerobios (v. pág. 36).

Procedimientos para el estudio de las condiciones vitales particulares de las bacterias

1. *Ensayo sobre la necesidad de oxígeno.* Su preparan cultivos, según uno de los métodos descritos para sembrar anaerobios. Las bacterias aerobias obligadas no germinan (al mismo tiempo, debe sembrarse el mismo medio de cultivo en contacto del aire.) Ensayos más sencillos: Si hay germinación en la rama cerrada de un tubo para fermentaciones (v. núm. 2) ó en cultivo (v. pág. 39 apart. 2 a) en la parte más profunda del medio de cultivo, dispuesto en capas de mucha altura.

2. *Ensayo sobre el poder de fermentación.*

Pueden utilizarse como substrato, medios nutritivos que contengan 0,25-0,5 % de glucosa (ú otro azúcar, event.) (v. pág. 14 caldo, Nr 1.) Los medios de

cultivo deben estar exentos de otras clases de azúcar, diferentes del que se añade de propósito. Por esto, en caso de que se trate de caldo de cultivo, se prepara este con carne vieja y algo descompuesta. Luego se ensaya el contenido en azúcar de una muestra del caldo, con *Bact. coli*, sembrado en tubos de fermentación (v. más abajo); si existe azúcar fermentable, se siembra el caldo, con *Bact. coli*, se tiene en la estufa á 37° durante 6-12 horas, se hierve luego, se filtra (en caso necesario según pág. 11 nr. 4 c), se ensaya de nuevo en el tubo de fermentación con el *Bact. coli* y se repite el procedimiento en caso de que haya todavía desprendimiento de gas. Finalmente, se neutraliza y añade la clase de azúcar que se quiere ensayar. Se neutraliza con sosa ó fosfato sódico ácido, nunca con carbonato sódico, porque los ácidos fuertes producidos en la germinación, darían lugar á un desprendimiento de CO₂ en burbujas, que constituirían una aparente fermentación del azúcar.

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

Como aparatos especiales de cultivo, se emplean tubos de vidrio doblados en forma de U (ó los llamados matraces de fermentación) una de cuyas ramas larga y cerrada, se llena completamente con el medio de cultivo líquido, escogido para fermentar; en el extremo de esta rama se recogen los gases desprendidos en la fermentación. La otra rama abierta, provista de un tapón de guata, debe contener pequeña cantidad de líquido ó estar provista de un ensanchamiento, destinado á contener el líquido desalojado de la otra rama por los gases desprendidos en la fermentación.—También pueden llenarse tubos de caldo casi hasta la boca y cerrarlos con un tapón, que está en contacto con el líquido y

por cuyo orificio pasa un tubo de vidrio de 30—40^{cm} de largo, ó más corto, y ensanchado en forma de bola, cerrado por un tapón de guata y que penetra profundamente en el caldo. El gas que se desprende, se reúne debajo del tapón y empuja el caldo que asciende por el interior del tubito (Se puede emplear también en los cultivos de anaerobios, si se cierra el tubo de modo que no quede aire entre el tapón y la superficie del caldo.)

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

Para hacer patentes los cambios de reacción sufridos por el medio, á consecuencia del desarrollo de las bacterias, puede añadirse al mismo una pequeña cantidad de tintura de tornasol ó solución acuosa de azolitmina al 1: 100, y dejar la reacción de modo que la adición de una gota de ácido ó álcali, en solución $\frac{1}{100}$ normal, dé coloración roja ó azul, sensible; luego se esteriliza (si con esto cambia la reacción, se corrige esta y se esteriliza otra vez) y se siembra. A menudo los medios con tornasol se decoloran, particularmente en las capas profundas, por reducciones (véase además pág. 46 nr. 4) debidas al desarrollo de las bacterias. Luego, se ensaya si el medio se colorea de nuevo por agitación (absorción de oxígeno.)

Los cambios de reacción son más visibles en el *sue-ro tornasol de Petruschy*: Se calienta leche á unos 40-50° y se le añade agua \overline{a} y el ácido colorhídrico necesario (no demasiado) para precipitar toda la caseína. Se filtra para separar el precipitado. Se neutraliza el

líquido filtrado con sol. de Na_2CO_3 (exactamente), se hierve 1-2 horas en corriente de vapor, se filtra hasta que pase claro (corregir la reacción si es necesario.)— El color debe ser de agua clara ó amarillo verdoso—se le añade tintura de tornasol hasta que quede de color violeta, se distribuye y se esteriliza.

Otros medios de cultivo coloreados, para reconocer los cambios de reacción, se describen al tratar del b. del tifus y el de la disentería, pág. 101 y siguientes y pág. 120.

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

4. *Ensayo sobre el poder reductor.* Se siembra en medios de cultivo, á los que se añade materias coloreadas fácilmente decolorables por reducción, como sulfoindigotato sódico (indigotina pág. 38 párraf. 2.) Tornasol (pág. 45 nr. 3) azul de metileno (de este debe añadirse solamente 1-2 gotas de solución al 1%, por cada 100 partes de medio de cultivo, puesto que en mayor cantidad produce retraso en la germinación.) La decoloración, se produce solamente en la parte del medio de cultivo no accesible al aire, por esto resulta más apropiada la observación en los cultivos de anaerobios ó en los medios de cultivo sólidos. Los medios líquidos decolorados por reducción, se colorean de nuevo agitándolos en contacto del aire.

5. *Ensayo acerca la formación de gas sulfhídrico.* Se añade al medio de cultivo un 3% de tartrato de hierro (preparado disolviendo en ácido tartárico, $\text{Fe}_2(\text{OH})_6$, obtenido por precipitación de Fe_2Cl_6 por la potasa, lavado y escurrido en un paño, se añade á la gelatina y se esteriliza al calor húmedo); ó bien se sus-

pende debajo del tapón de guata, una tira de papel de filtro humedecido en acetato de plomo; ó bien se humedece el extremo del tapón de algodón, introducido en la boca del tubo, en solución hervida, de acetato de plomo. Un ennegrecimiento del medio de cultivo, del papel ó del algodón, denota formación de SH_2 .

6. *Ensayo acerca la formación de indol.*

1. Según Kitasato Salkowshi.—Se añade á un cultivo puro, en caldo peptonado ó en agua de peptona, 1^{cc} de solución al 0.01% de nitrito sódico y 1^{cc} de ácido sulfúrico puro (1+3 de agua destilada). Al cabo de 5 minutos aparece un color rojo en presencia de indol.—Muchas bacterias además del indol, producen nitritos, por reducción de nitratos existentes (ó adicionados) en la peptona (vibrión del cólera ú otros parecidos.)—Sus cultivos dan por esta causa, la coloración roja con solo añadir ácido sulfúrico ó clorhídrico (sin añadir NaNO_2)—es la llamada *reacción del nitrosoindol*.

2. Según Ehrlich (Böhme, C. B. I. T. 40, pág. 129). Se añaden á 10^{cc} del cultivo líquido, 5^{cc} de sol. a) y luego, 5^{cc} de sol. b) y se agita. Si hay indol se produce coloración roja á los 5 minutos. Más sensible que el núm. 1. La solución a) consta de 4 de paradimetilamidobenzaldehido + 380 de alcohol de 96% + 80 de HCl concentrado. La solución b): solución acuosa saturada de persulfato potásico ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$).

7. *Ensayo acerca la formación de cromoproteidos.* Cultivos hechos en caldo peptonado al 5% ó en agua de peptona al 3%, se acidulan ligeramente con ácido acético y luego se les añade, gota á gota, agua de cloro saturada y preparada recientemente (ó bien se le cubre con una capa de agua de cloro.) Una coloración

rojo-violeta (ó un anillo rojo violeta en la superficie de contacto) denota la presencia de cromoproteidos. (Erdmann y Winternitz- M. M. W. 1903 pág. 982.)

8. *Ensayo sobre la producción de luz (Fosforescencia)*. La germinación es frecuentemente ventajosa en medios que contengan mucho cloruro sódico (1-3 %) en capa superficial (por ser necesaria la presencia del aire). Observar los cultivos en un sitio obscuro, durante algunos minutos por lo menos, puesto que el brillo de la luz se percibe lentamente muchas veces. Muchas especies brillan sólo en cultivos muy jóvenes y durante corto tiempo.

9. *Ensayo de la resistencia al calor y á la desecación. Resistencia para el calor en espacio húmedo*: Se introduce en tubos capilares estériles, cultivo puro líquido bien germinado, se funden ambos extremos de aquellos y se colocan en un baño de agua ó en autoclave abierto, á la temperatura que se ensaya y durante un tiempo determinado. Se lavan luego los capilares (por fuera) con sublimado, alcohol y con éter, se cogen con unas pinzas estériles, y introducen en tubos con medio de cultivo apropiado y se rompen en el interior de estos, mediante una varilla de vidrio esterilizada. Se observa, siempre durante varios días, si hay germinación. Las esporas resisten siempre la temperatura de 60° durante 1/2 hora, en muchos casos 80° durante 10 min.—Todos los cultivos en caldo pueden calentarse del modo descrito; deben sumergirse en el baño de agua, un poco más que el nivel del líquido interior; es preciso colocar un termómetro en uno de los tubos, para comprobar la marcha de la temperatura. Enfriar rápidamente después de calentar. Antes de sembrar el contenido de estos, en otros tubos, es conveniente tenerlos en la estufa durante algunos días á una temperatura apropiada; con esto tienen ocasión de desarrollarse los

gérmenes que quedaron con vida y pueden reconocerse fácilmente, sembrando (abundante cantidad) en caldo reciente.

Resistencia para la desecación: El material de cultivo (caldo de cultivo ó bien el medio sólido finamente desmenuzado y empapado del cultivo) se deja secar sobre pedazos de cobre-objetos ó varillas de cuerno, esterilizados, colocados en cápsulas tapadas, también estériles; de cuando en cuando se echan pedazos á la solución nutritiva y se observa si hay germinación. También puede ensayarse de este modo la acción del calor seco. Del mismo modo, pueden humedecerse pequeñas hebras de seda en el material de cultivo, se desecan y se observa la resistencia á la desecación, al calor seco y al vapor (envolviéndolos en papel de filtro y teniéndolos á 100°, en corriente de vapor, durante un tiempo determinado en aparato á propósito, etc.,) (esporas del b. anthracis v. pág. 81).

10. *Ensayo de la resistencia á los desinfectantes químicos.* El poder de retardar ó impedir la germinación, de los desinfectantes químicos, se pone de manifiesto, sembrando en medios de cultivo, que contengan una cantidad conocida de desinfectante.

La influencia destructora de los desinfectantes se puede observar más sencillamente, introduciendo en soluciones concentradas de los mismos, durante un espacio de tiempo variable, pedazos de cobre-objetos ó hebras de seda, impregnados de las bacterias que se ensayan, y desecados. Antes de sembrar en las soluciones nutritivas, enjuagar con agua estéril ó lavar en solución mezclada con desinfectante, aunque sin actuar como á tal ó bien sembrar en abundante solución nutritiva agitando fuertemente.

11. *Ensayo de la patogénesis,* v. pág. 165 y sigs.

12. *Ensayo acerca de la formación de toxinas.*

Las toxinas pueden estar disueltas en el medio de cultivo ó retenidas en el cuerpo de la bacteria.

Toxinas disueltas en el medio: Se filtran los cultivos en medios líquidos libres de gérmenes (v. pág. 11 nr. 4, c.) y se inyecta el líquido filtrado á un animal de experimentación (v. pág. 166). *Toxinas retenidas en el protoplasma bacteriano:* Se matan los cultivos en medios sólidos, por los vapores de cloroformo ó toluol. (Se echan algunas gotas de cloroformo ó toluol en la cara inferior del tapón de guata, se cierran los tubos con este último y con un dedal doble de goma y se ponen en la estufa á 37°, durante una ó varias horas; debe tenerse cuidado en no perjudicar otros cultivos de la estufa) y luego se inyectan al animal, sin mezclarlos con el medio de cultivo; al mismo tiempo se ensaya, haciendo siembras del medio, si han muerto todos los gérmenes. (Dosificación del material que se inyecta, v. pág. 168.)

V

Métodos de coloración. Generalidades

Modo de obtener las preparaciones

1. Preparaciones ordinarias

Se limpia cuidadosamente un cubre-objetos, (Preparaciones sobre porta-objetos v. pág. 54) se le coloca encima gota de agua con la öse de platino, y luego mediante una aguja ó öse de platino, una pequeña cantidad de la materia que se analiza. Se extiende la gota de agua, en capa uniforme y delgada sobre el cubre-objetos (que debe estar exento de grasa por completo, con lo cual se efectúa bien.—Modo de limpiar v. página 7), se deja secar al aire la preparación, pudiendo acelerarse la desecación calentando ligeramente el cubre-objetos, con la cara preparada vuelta hacia arriba.

Los líquidos que contienen pocas bacterias, como sangre, pus, se colocan directamente sobre el cubre-objetos, sin añadirle gota de agua (para la sangre véase además pág. 153); si se trata de órganos animales, se arranca un pequeño fragmento de los mismos mediante una pinza estéril, y con él, se frota la superficie de un cubre; las substancias con las que difícilmente se puede frotar, como por ejemplo, esputos viscosos, tumores nudosos, muchos cultivos bacterianos, se pueden colocar entre dos cubre-objetos estériles, sosteni-

dos mediante 2 pinzas de Cornet, para extenderlos. Debe cuidarse de que los dedos no se contaminen. (Preparaciones por compresión v. pág. 34.)

Modo de fijar: Los cubre-objetos desecados al aire, se cogen con dos dedos (si no tiene los bordes infectados ó manchados, de lo contrario con una pinza de Cornet) junto al borde y se pasan tres veces por la llama de gas ó de una lámpara de alcohol, con la cara preparada vuelta hacia arriba. Si con esto queda la preparación á una temperatura, que casi no se puede resistir en contacto de los dedos, se ha alcanzado el grado de calor conveniente. La preparación fijada de este modo se puede colorear cuando se quiera.

La fijación con alcohol absoluto y también con alcohol éter \bar{a} , da resultados excelentes y es la preferente cuando se trata de preparaciones de sangre. Para obtener imágenes delicadas, se recomienda la fijación con ácido ósmico: Se colocan pequeñas cápsulas, tapadas con tela metálica, en el interior de grandes frascos de boca ancha cuyo tapón ajuste bien, y en cada una de aquéllas se ponen 5 c. c. de solución de ácido ósmico al 1 % (en caso necesario, + 10 gotas de ácido acético en las preparaciones de sangre). Sobre la tela metálica se colocan las laminillas, con la cara preparada vuelta hacia abajo, y se dejan $\frac{1}{2}$ — 2 min., luego se lavan en caso necesario con solución muy débil de KMnO_4 . Se dejan secar al aire y se colorean. Conviene poner al rojo cada vez, la tela metálica, antes de usarla. La solución de ácido ósmico puede actuar durante varias semanas.

Cuando se está en duda sobre que cara del cubre-objetos es la preparada, se sopla sobre el vidrio—la cara no preparada aparece mate uniformemente, mientras que la preparada no—ó bien, se mira con una aguja fina si puede separarse algún fragmento.

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

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

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

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

En caso de que después de teñida la preparación, deba tratarse por otros líquidos, se echan estos directamente sobre el cubre-objetos, ó bien en copas pequeñas (de las de licor, de fondo plano) ó en vasijas parecidas, en las que se sumerjen los cubre-objetos.

Inclusión en bálsamo: Para observar las prepara-

ciones, puede emplearse también el bálsamo del Canadá ó el aceite de cedro (del usado en inmersiones), en lugar del agua. Se coloca el cubre-objetos en posición vertical, apoyado en algún objeto, sobre papel de filtro y se aguarda hasta que se haya secado ó bien se seca cuidadosamente el cubre teñido y lavado, entre papel de filtro ordinario (comprimiéndolo únicamente, sin frotar, porque sinó podrían perderse partículas de la preparación; luego con un pincel fino, se separan los hilos del papel que hayan quedado). Luego se pone en la cara teñida del cubre-objetos, una gota de aceite de cedro del de inmersión ó de bálsamo del Canadá, espeso, disuelto en xilol y se coloca aquél, comprimiéndolo, sobre la superficie limpia y seca de un porta-objetos. El bálsamo ó el aceite, no deben rebasar el borde del cubre-objetos; en caso de que esto suceda, se separa el exceso al cabo de algunos días, si se ha solidificado ya y el cubre está sólidamente unido al porta-objetos, por medio de papel de filtro humedecido en xilol; del mismo modo se separa el aceite que haya quedado sobre el cubre. El bálsamo del Canadá hace palidecer los colores lentamente; por esto es mejor montar en aceite de cedro las preparaciones que quieran conservarse. Rotular enseguida!

Si se quieren montar las preparaciones en agua para conservarles debe absorberse primero con papel de filtro el aceite de inmersión de su superficie, se limpia ésta luego, vertiendo abundante agua alrededor del borde del cubre, y se separa de aquél, se deja secar y se monta luego como antes se ha dicho.

Preparaciones sobre los porta-objetos: Sobre estos, se pueden obtener preparaciones secas, del mismo modo que sobre los cubre-objetos. Son recomendables, para el caso en que quiera teñirse y observarse de una sola vez, mucha materia. Fijar y teñir la capa como en

los cubre-objetos. Para la observación, se deseca la superficie con papel de filtro ó al aire, se pone una gota del aceite de inmersión y se examina sin cubre. En caso de que deseen conservarse, se coloca en el sitio más interesante de la preparación, bálsamo y un cubre-objetos.

Determinación del tamaño de las bacterias: Se verifica del modo más sencillo, por comparación con glóbulos rojos de la sangre (estos tienen de 7-9 μ de diámetro); si no existen éstos (como p. ej. en los cultivos) se mezcla el material bacteriano con una gota de sangre extraída de un dedo.

2. Preparaciones de cortes

Endurecimiento de los fragmentos de tejidos: Se endurecen pequeños fragmentos de órganos, que en todo caso han de tener á lo más, el tamaño de la yema de un dedo, teniéndolos por lo menos durante tres días, en alcohol absoluto que se renueva muchas veces. (En el fondo de la vasija empleada para indurar, se coloca una hoja de papel de filtro. Sobre esta se colocan los fragmentos orgánicos que han de endurecerse; con esto se consigue tenerlos siempre en las capas superiores de alcohol menos acuosas y de este modo pueden conservarse durante años, no obstante muchas bacterias pierden poco á poco la propiedad de teñirse). Antes de endurecer por el alcohol, se pueden tener los pedazos 12-24 horas en formalina, para tener una buena fijación—método rápido véase página 58.

Para obtener cortes, se emplean los microtomos y se procura obtener cortes muy delgados (finos). Para este objeto se preparan antes los tejidos endurecidos, por inclusión ó encolado, para lo cual se emplean los siguientes métodos (1 y 2 se emplean sólo para tejidos

compactos y parenquimatosos, el 3 y 4 especialmente para tejidos flojos y para pequeños pedazos).

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

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

3. *Inclusión en parafina*: Los fragmentos endurecidos, se ponen en xilol durante algunas horas, hasta algunos días (si son transparentes), luego durante un tiempo igual, en una solución de parafina en xilol, después en parafina fundida y caliente á 50° (mezclando diversas clases de parafina, se puede obtener una de este punto de fusión) teniéndolos en ésta (en baño de parafina caliente á 50°, que se regula de igual modo que

las estufas) durante 1-2 horas. Los fragmento de órganos completamente empapados en parafina, se cogen con una espátula, se colocan sobre una lámina de vidrio limpio, se les coloca encima moldes de cristal, metal ó de cartón cuadrangulares y de unos 2 cm. de altura, de modo que el fragmento quede en medio, y se vierte en su interior parafina caliente hasta llenarlo, la parafina puede solidificarse rápidamente sumergiendo la placa de vidrio en agua fría. Los bloques de parafina se proveen de etiquetas (sujetándolas con alfileres), en caso de que no se destinen inmediatamente á obtener cortes. Antes de efectuarse esto, debe separarse con un cuchillo la parafina, hasta que aparezca en la superficie el objeto incluído. Se corta con la cuchilla del microtomo en seco. Los cortes se colocan en una cápsula con agua caliente á 40-45°. En esta se extienden rápidamente los cortes, quedando lisos en la superficie. Se separan los cortes del agua con un cubreobjetos limpio, de modo que queden extendidos sobre este, se coloca el porta en posición inclinada, se lava con agua, se deseca completamente en la estufa á 37° y luego en estufa de parafina, hasta que esta se hunda y empiece á escurrirse. Se separa entonces la parafina enjuagando con xilol y éste se separa con alcohol absol. El corte se coloca fijo sobre el porta.

Congelación en esencia de anís: Se separa el alcohol de los fragmentos de tejidos, cuanto sea posible, absorbiéndolo con papel de filtro y luego se pone por lo menos 24 horas en esencia de anís (licuada en la estufa á 37°, y colocada luego, junto con los fragmentos orgánicos, en frascos de vidrio que cierren perfectamente y puesto todo en la estufa á 37°). Luego se coloca el objeto, junto con algunas gotas de esencia, en un microtomo especial, se congela la esencia mediante vapor de éter y se efectúan los cortes. Se colocan éstos en

esencia de anís caliente á 37° y se les separa la esencia después de fundida, absorbiéndola y sumergiendo los cortes en alcohol absoluto, que se renueva varias veces antes de teñir. Se puede emplear la manteca de cacao, de un modo parecido.

Endurecimiento é inclusión rápidos:

- a) Según *Lubarsch* (D. M. W. 03. nr. 48.) Los fragmentos de tejidos (lo más recientes posible) de 1-5 mm. de grueso, se tratan en caliente (en estufa de parafina á 50-60°):—1. 10-15 min. en solución de formalina al 10 0/0.—2. En alcohol de 90-95 0/0, 5 ó 10 minutos, se renueva el alcohol una vez.—3. 10 minutos en alcohol absoluto; (una vez) renovar éste.—4. Sumergirlo en aceite de anilina del todo claro, hasta que el fragmento esté completamente transparente (10 á 30 minutos).—5. Separar el aceite de anilina con xilol, cambiar dos ó tres veces el xilol hasta que no se colorea en amarillo (10 ó 20 minutos).—6. Incluir en parafina 10-60 minutos.—Duración del procedimiento de 1½-3 horas.
- b) Según *Henke-Zeller* (Ctrbl. J. path. Am. 05. Nr 1). Los fragmentos de tejidos, de 1-3 mm. de grosor se tienen á 37°, durante 30-40 min. en acetona anhidra, y luego durante el mismo tiempo, en parafina. Duración del método 1-1½ horas.
- c) Según *Scholz* (D. m. W. 05. nr. 11). Los fragmentos de tejidos de un grueso de 3-5 mm. se ponen en la estufa á 37°, durante 30-50 min. en acetona pura. Luego se agitan con éter + alcohol absol. a a, se incluyen en celoidina flúida (siempre en la estufa). A las 4-5 horas, en celoidina espesa durante 2-3 horas. Pasarlos á capsulitas planas. Desecar rápidamente, debajo de una campana, por el vapor de cloroformo; se puede hacer los cortes á las 12-14 horas.

Para *teñir* los cortes, se separan del alcohol y se

les somete á coloración simple primero—1-3 cortes cada vez en capsulitas (son preferibles los pocillos de cristal cuadrangulares á los vidrios de reloj, que pueden volcarse fácilmente;) siempre en soluciones colorantes filtradas recientemente. (Colocándolos en la estufa á 37°, se acelera la coloración en gran parte.) Luego se hace la «diferenciación» de los elementos de los tejidos, coloreados difusamente al principio, dándoles colores apropiados; para ello se emplean ácidos diluidos, alcohol diluido ó ácido (v. indicaciones especiales, en métodos de coloración simple). Los cortes teñidos intensamente al principio, adquieren con esto una coloración clara. Luego se deshidrata con alcohol absoluto (para preparar el ulterior aclaramiento de los cortes). Los cortes se vuelven en seguida duros y rígidos, por lo cual deben ponerse desde luego en alcohol y extenderlos cuanto sea posible; se mantienen en las capas superiores del alcohol porque son menos acuosas. Luego se ponen para aclararlos, en aceite de cedro (no el de inmersión, denso, sino el aceite ordinario) ó en esencia de bergamota, de orégano ó de clavos (decoloran fuertemente) ó en xilol (se enturbia con sólo un indicio de agua). Desde las cápsulas con las esencias, se pasan los cortes á un porta objetos y puede ser observados en la esencia, cubriéndolos con un cubre-objetos. Si se quieren conservar, se absorve la esencia, se enjuaga con xilol y se colocan sobre el corte unas gotas de bálsamo del Canadá, disuelto en xilol, poniéndole encima un cubre. Los cortes aclarados con xilol, no se deben observar en éste, porque se evapora, sino en bálsamo del Canadá. El bálsamo se endurece en pocos días. Para separar el bálsamo excedente, véase pág. 54. Los cortes desecados sobre porta-objetos, (v. pág. 57, se tratan de modo análogo, sólo que en ellos pueden colocarse los colorantes sobre los cortes ó bien sumer-

gir todo el porta-objetos en la solución. Los cortes no incluidos en parafina, pueden también desecarse sobre los porta-objetos y colorearse. Véanse métodos de coloración simple.

Observar siempre al principio con poco aumento, para orientarse en la coloración de los cortes y en las transformaciones patológicas grandes de los tejidos.

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

Substancias empleadas en la coloración de las bacterias

Se emplean principalmente, los siguientes colores básicos de anilina: Violeta de genciana y violeta metilo, dalia, azul de metileno, fuchina y (los compuestos muy semejantes) Rubina, Pardo Bismark (Vesubina). Además de las bacterias se tiñen intensa y permanentemente los núcleos celulares. Los demás elementos de los tejidos en grado menor. Las soluciones de azul de metileno, no actúan bien en caliente, las demás soluciones sí.

Para teñir los elementos de los tejidos con colores de contraste, se emplean para las bacterias (además de los básicos) colores ácidos de anilina (Eosina p. ej.) que no tiñe bien los núcleos, y entre otros colorantes,

el carmín, (muchos microorganismos se tiñen también con este colorante tales son p. ej: *Stafilococcus pyogenes*.) Se emplean sólo colorantes de fábricas acreditadas para evitarse fracasos.

Preparación de soluciones sencillas para la coloración simple

1. Soluciones en alcohol acuoso:

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

2. Soluciones acuosas:

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

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

Soluciones reforzadas de colores de anilina

Tiñen mas intensamente que las soluciones sencillas.

- a) *Solución de azul de metileno, según Loeffler.*
30^{cc} solución saturada de azul de metileno, en alcohol.
100^{cc} de potasa al 0,01 % (=1^{cc} de potasa al 1 %, en 100 de agua). inalterable, duradera.
- b) *Soluciones colorantes de agua de anilina.* Se echa aceite de anilina (del todo claro) en un tubo de ensayo, hasta llenar el fondo del mismo, llénase luego hasta $\frac{3}{4}$ con agua y se agita fuertemente. Debe quedar aceite de anilina no disuelto, después de la agitación. El líquido filtrado por un filtro húmedo, debe ser claro como agua (no verter la anilina en el filtro!) y no ha de contener gotitas de aceite (en caso necesario filtrarlo de nuevo.) Se le añade luego solución saturada en alcohol, de violeta genciana, violeta metilo ó fuchina hasta que el líquido esté casi opaco (puesto en un tubo de ensayo) ó hasta que aparezca en la superficie una película nacarada. Ó bien, se disuelve la materia colorante en agua de anilina, hasta que quede una parte insoluble. El poder colorante de la solución se aumenta añadiendo 1^{cc} de solución de KOH al 1 % por cada 100 cc. Estas soluciones son alterables, y el agua de anilina también.
- c) *Fuchina fenicada, según Ziehl-Neelsen:*
100^{cc} de ácido fénico al 5 %
10^{cc} de solución saturada de fuchina en alcohol.
Se emplea diluida 3-4 veces y durante largo rato y tambien sin diluir, sin que por esto tiña mas fuertemente. Muy inalterable.

- d) *Fuchina fenicada, glicerniada, según Czaplewski.*
1 gr. de fuchina se deshace en 5^{cc} de ácido fénico líquido. Añadir 50^{cc} de glicerina y luego 100^{cc} de agua dest. Se emplea diluida hasta 4—10 veces. Inalterable.
- e) *Azul metileno fenicado según Kühne;*
1.5 de azul metileno.
10^{cc} de alcohol absoluto.
100^{cc} de ácido fénico al 5%. Se conserva bien.

Coloración simple de las preparaciones sencillas

Se efectúa principalmente con soluciones de azul de metileno, fuchina, violeta de genciana, como se ha dicho en las págs. 53 y 58.

La elección de la materia colorante, depende de la predilección del observador por uno ú otro colorante. Muchas bacterias no obstante, se colorean mejor con unos colorantes determinados, que con los demás (v. g. b. diftérico pág. 94 vibrión colérico, pág. 123.) La sangre, el pus, frotos de tejidos, se colorean generalmente de un modo perfecto, con el azul de metileno; las preparaciones teñidas con azul de metileno para conservarlas, deben montarse en aceite de cedro del usado en la inmersión, nunca bálsamo del Canadá (v. pág. 54).

Coloración simple de cortes

a) *Según Loeffler:*

1. Colorar con solución alcalina de azul de metileno (agua de anilina ó solución de fuchina fenicada) 5—30 min.

2. Diferenciar en ácido acético al $\frac{1}{2}$ —1 0/0, hasta que el tejido quede distinto (algunos segundos ó hasta medio minuto, según el grueso del corte y la intensidad de coloración.)
 3. Deshidratar en alcohol absoluto (renovar, mientras se colorea.)
 4. Aclarar con aceite de cedro, etc. Los bacilos y tejidos aparecen azules (ó rojos.)
- b). *Según Pfeiffer:*
1. Colorar en fuchina fenicada diluída (sol. Ziehl + ag. al 1: 3).
 2. Pasar al alcohol absoluto + 1—2 gotas de ácido acético en cada capsulita. Tan pronto los cortes empiecen á aparecer rojoviolados,
 3. Pasar al aceite de cedro ó xilol, etc.
- c) *Con violeta de genciana:*
1. Teñir con solución acuosa 15-30 min.
 2. Lavar primero con alcohol al 50 0/0, luego con alcohol absol. hasta que los cortes tengan color violeta claro.
 3. Aclarar en aceite de cedro, etc.
- d) *Según Kühne Pregl:*
1. Colorar en azul de metileno fenicado $\frac{1}{2}$ -1 min.
 2. Enjuagar un poco en agua.
 3. Decolorar en alcohol al 50 0/0 hasta tener los cortes de color azul pálido (con un tono verdoso.)
 4. Deshidratar en alcohol absoluto.
 5. Aclarar en aceite de cedro, etc.
- e) *Método del azul de metileno-tanino según Nicolle:*
1. Teñir con azul de metileno alcalino ó con el fenicado como en *a* y *d*.
 2. Enjuagar en agua ó en ácido acético al $\frac{1}{2}$ -1 0/0 algunos segundos.
 3. Pasar al una solución de tanino al 10 0/0 (por

lo que el azul de metileno se hace insoluble) durante algunos segundos. (También es suficiente una solución de tanino al 1 %).

4. Enjuagar en agua, deshidratar en alcohol absol., aclarar en aceite; etc.

Se emplea para bacilos que se decoloran fácilmente. (Tifus. muermo, etc.)

f) Método á la Thionina, según Nicolle:

1. Teñir en solución de thionina $\frac{1}{2}$ -1 min. (sol. saturada de thionina en alcohol al 50 % y se ponen 10 en 100 de agua fenicada al 1 %.)
2. Enjuagar en agua.
3. Deshidratar en alcohol absol. luego aceite, etc.

El resto como en el método *e* para bacilos fácilmente decolorables.

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

Coloración de bacterias aisladas, coloración por contraste

I. Según Pick-Jacobsohn. Para preparaciones ordinarias, se tiñe á lo más 8 segundos, con una mezcla de 15 gotas de fuchsina fenicada Ziehl (pág. 62, c.) 8 gotas de solución alcohólica saturada de agua de metileno, y 20 de agua destilada. Bacterias de color azul oscuro, núcleos azul claro, el resto del tejido rojo. Las soluciones colorantes guardadas mucho tiempo, se mejoran añadiéndoles algo de fuchsina fenicada.)

II. Coloración con azul de metileno-eosina:

1. Teñir $\frac{1}{2}$ minuto con una mezcla reciente, de 30 gotas, de solución de azul metileno de Loeffler (pág. 62) con 10 de solución alcohólica saturada de eosina.

2. Enjuagar en agua.
Bacterias y núcleos azules, protoplasma celular, rojo.

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

Se mezclan unos 1000 cm. de solución acuosa de eosina al 1 ‰, con 1000 cm. de azul de metileno medicinal Höchst, también al 1 ‰ y se filtra al cabo de algunos días. El residuo se lava con agua, hasta que ésta pase limpia. Luego se disuelve el residuo seco, en alcohol metílico, hasta obtener solución saturada y se emplea (sin fijar previamente en el cubreobjetos) para teñir en frío (algunos minutos, hasta horas). Luego se enjuaga con agua + algunas gotas de la solución. Emplear colorantes del Dr. Schwalm, München-Sonnenstrass. 10. Especial para preparaciones de sangre y de pus. *Assmann*, M. M. W. 1906 N.º 28, recubre las preparaciones con 40 gotas de solución y durante 3 minutos en cápsulas de Petri, añade luego 20 cm. agua destilada + 5 gotas de K_2CO_3 al 1 ‰, agita y deja teñir durante 5 minutos. Luego se deseca, sin lavar, etc.

IV. **Coloración de Gram.** (Al mismo tiempo que para teñir perfectamente las bacterias, se emplea como medio diagnóstico, ya que sólo algunas especies bacterianas determinadas se puede reconocer por él, perfectamente, véase pág. 69.)

a) *Preparaciones ordinarias.*

1. Teñir la preparación con solución violeta de genciana- agua de anilina ó con violeta metilo- agua de anilina (véase pág. 62), en caliente, por lo menos 2 minutos. Las materias colorantes más apropiadas, son los violetas de metilo Höchst 6 B y B N.

(1 a. Enjuagar en agua de anilina (puede dejarse en ella.)

2. 30 segundos hasta 2 minutos, en solución iodoiodurada. (Se disuelve 1 de Iodo, 2 KI en 5 de agua destilada y después de disuelto se añaden 295 de agua destilada). Con ello se forma en el cuerpo de ciertas especies bacterianas (véase cuales, página 69) una materia colorante iodada, insoluble en alcohol.
 3. Decolorar la preparación en alcohol absoluto, hasta que aparece incolora á la vista. Así quedan las bacterias aisladas, que se tiñen por él. Gram, de color negro-azulado y todas las demás bacterias y elementos de los tejidos (hasta los núcleos sencillos) incoloros. Se pueden observar los cubreobjetos en agua (ó después de secos, en bálamo.)
 4. Nueva coloración con soluciones de vesubina, safranina ó fuchsina en alcohol acuoso ó con picrocarmín (véase pág. 71) durante 2-10 minutos. Esta segunda coloración hecha con vesubina ó fuchsina, tiene la ventaja de que las bacterias que se encuentran en la preparación sin estar teñidas por el violeta, se colorean más notablemente que con safranina ó carmín.
 5. Lavar con agua.
Las bacterias que toman el Gram quedan negro-azuladas. Los tejidos rojos.
- b) *Cortes* (aplíquense aquí las observaciones de a.)
1. Teñir con violeta de genciana en agua de anilina ó con violeta de metilo, 5-30 minutos.
 - 1 a.) Enjuagar con agua de anilina 30 segundos (Puede prolongarse.)
 2. Pasar la preparación á solución de iodo iodurada 1-2 minutos. Los cortes quedan en ella, de un color pardo-negro.
 3. Lavar con alcohol absoluto, hasta que el corte

aparezca incoloro del todo ó casi incoloro. Con ello, quedan teñidos en azul negruzco únicamente las bacterias aisladas que se tiñen según Gram. Se puede aclarar en aceite de cedro, ó bien teñir por contraste el tejido y las bacterias existentes que no se colorean según Gram. (4-7.)

4. Segunda coloración con picrocarmín (véase página 71), safranina ó fuchsina diluída, 5-10 minutos (después de un lavado con agua ó alcohol diluído.)
5. Enjuagar en alcohol al 60 %.
6. Deshidratar en alcohol absoluto.
7. Aclarar en aceite de cedro, etc.

Pueden anticiparse los números 4-5 y omitir por tanto 1-3 y 7.

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

Modificaciones del método de Gram.

α) En lugar de preparar las soluciones colorantes con agua de anilina, puede hacerse con agua fenicada al 1-2 $\frac{1}{2}$ %, que se conserva largo tiempo. Después de teñir, se puede enjuagar con la citada agua fenicada por tanto. También puede añadirse á la solución colorante, 1 % de solución alcohólica saturada de azul de metileno.

β) Para acelerar la decoloración puede emplearse según Günther, en lugar del alcohol, alcohol absoluto, según Nicolle alcohol + 20-30 % de acetona (Nicolle

emplea violeta de genciana en agua fenicada con 1 % de ésta, solución de iodo en ioduro potásico 1 I + 2 JK + 200 agua.

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

No puede emplearse el método Gram (porque las bacterias se decoloran por el alcohol) en el reconocimiento del b. tífico, b. coli y sus semejantes, b. disentería, vibrión colérico y sus semejantes, cólera de las gallinas y septicemia de los conejos, b. del edema maligno y b. Chavoei (quedan teñidos y sin teñir, véase además pág. 70-71 nr. VI) b. pneumonía Friedländers, b. de la peste bubónica, b. muermo, b. influenza, b. Koch-Weck, conjuntivitis epidémica, b. chancro blando, espiroquetas de la sífilis y de la fiebre recurrente, gonococos, meningococos.

Para observar el modo de comportarse los cultivos bacterianos respecto á la *coloración Gram*, se emplean siempre cultivos jóvenes y se toma para la observación, un poco de materia de un cultivo joven de b. anthracis ó de stafilococcus pyog. aureus, y se extiende sobre cubre-objetos y porta-objetos, como en las preparaciones ordinarias; ejecutando el método perfectamente, quedan teñidos en negro-azulado los b. anthracis y estafilococos. Los tratamientos con alcohol no han de ser

breves, porque sino quedan teñidas todas las bacterias por el Gram.

Eventualmente, sirve para teñir por contraste las especies bacterianas observadas junto con b. tífico ó vibrión colérico, que no se tiñen por el Gram.

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

1. Teñir con litio-carmin (Carmin 2,5-5 disuelto en solución acuosa saturada de carbonato lítico, 100.) ó con solución de safranina en alcohol, $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora (también en fuchsina fenicada Ziehl 1 + 4 Aq. dest.)
2. Enjuagar con solución de NaCl al 50 %.
3. Colorar con violeta de genciana en agua de anilina 5-30 minutos.--O según Kühne con la solución siguiente: Cristal violeta 1 disuelto en 10 de alcohol absoluto; 1 parte de esta en 10 de ag. dest. + 2 gotas de HCl.
4. Enjuagar en solución de NaCl al 0.6 %.
5. Pasar los cortes á un porta-objetos y desecarlos con papel de filtro.
6. Tenerlas 1-2 minutos en sol. iodoiodurada.
7. Desecar con papel de filtro.
8. Decolorar con anilina, hasta que ésta no se tiña. Se comprueba la coloración de los cortes con el microscopio.
9. Separar la anilina con xilol.
10. Bálsamo del Canadá.

Bacterias azul violeta, fibrina azul obscuro, tejidos rojo. El picrocarmín no es apropiado para teñir los tejidos en particular, porque la anilina separa el ácido pícrico en los cortes.

VI. *Según Claudius*: Equivalente á la coloración Gram. (El ácido pícrico actúa como el iodo-ioduropotásico) da menos precipitado que éste, y pone de mani-

fiesto también el b. del edema maligno y el b. Chauvoei, tiñéndolos de negro azulado.

a) *Para preparaciones ordinarias.*

1. Teñir en violeta de metilo, solución acuosa al 1 %, 1 minuto, luego enjuagar en agua, secar con papel de filtro.
2. Enjuagar con solución acuosa saturada de ácido pícrico + ag. dest. $\overline{a a}$.
3. Enjuagar con agua, secar con papel de filtro.
4. Lavar con cloroformo ó con esencia de clavos, hasta que la preparación aparezca incolora.
5. Desecar con papel de filtro, montar en bálsamo.

b) *Para cortes* (es preferible operar sobre los porta-objetos.)

1. Teñir como en a), 2 minutos ó más.
2. Enjuagar en agua, secar con papel de filtro.
3. Acido pícrico como en a) 2, 2 minutos.
4. Lavar cuidadosamente con agua y secar con papel de filtro.
5. Tratar por esencia de clavos, hasta que el corte aparezca incoloro.
6. Xilol, bálsamo del Canadá.

Bacterias azules, tejido incoloro ó amarillento, aunque pueden teñirse por contraste con solución de carmín (como en el procedimiento Gram.)

Solución de picrocarmín para teñir por contraste los tejidos.

a) *Preparación según Friedländer:* Se disuelve 1 de carmín en 50, de ag. dest. + 1 de amoníaco. Se añade solución acuosa saturada de ácido pícrico, hasta que el precipitado que se forma no se redissuelva agitando. Añadiendo un poco de amoníaco se disuelve de nuevo. Para impedir el desarrollo de microorganismos en la solución, se le añaden unas

gotas de ácido fénico. Fíltrese antes de utilizarla. Solución inalterable.

- b) *Preparación según Weigert*: Se ponen en maceración 2 de carmín en 4 de amoníaco, 24 horas. Luego se añaden 200 gr. de solución acuosa saturada de ácido pícrico y al cabo de 24 horas, se añade ácido acético gota á gota, hasta que aparezca precipitado, luego se añade amoníaco gota á gota hasta que esté de nuevo clara la solución.

Coloración de cápsulas

Muchas cápsulas de bacterias quedan teñidas en los cubre-objetos, tratándolas largo tiempo y en caliente, por soluciones *Ziehl* ó *Loeffler* (pág. 61 *a* y *c*), en azul-violado pálido ó en rojo. Los métodos particulares para teñir cápsulas son los siguientes:

- a) Según *Weidenreich-Hamm*. C. B. I. T. 43. página 287. Se hace la preparación en un gota de suero. Se fija con ácido ósmico (pag. 52) á lo más durante 30-40 seg. Luego se tiñe con la solución de Giemsa (pág. 148 *c*).
- b). Según *Johne*:
1. Teñir en caliente con sol. acuosa de violeta de genciana al 2 0/0, 1-2 mín.
 2. Lavar con agua.
 3. Decolorar con ácido acético al 1-2 0/0, durante 6-10 seg.
 4. Lavar con agua y observar en ella. El bálsamo del Canadá hace desaparecer las cápsulas!
- c) Según *Ribbert* (sólo para preparaciones ordinarias.)

1. Teñir el cubre-objetos durante algunos segundos con la solución siguiente:

100 de ag. dest. 50 alcohol absol. 12,5 de ácido acético cristal, + Dahlia (la cantidad que se disuelva en caliente.)

2. Enjuagar en agua, observar en ésta, ó secar, y montar en bálsamo (este último hace borrosas las cápsulas.)

d) Según *Nicolle* (para *frotés y cortes*.)

1. Teñir con la siguiente mezcla: Solución de violeta de genciana en alcohol de 95 % 10, y agua fenicada al 1 %, 100 partes.

2. Lavar con alcohol absol. + $\frac{1}{2}$ volumen de acetona. Lavar con agua para frotés: alcohol absol. esencia, etc., para los cortes.

e) Método de *Bunge* para teñir *cirros*. (v. pág. 77.)

- f) Véase en la pag. 81, métodos de coloración del b. anthracis, aplicables á otras muchas bacterias.

Coloración de esporas

- a) 1. Teñir las preparaciones, calentando bastante, con fuchsina anilinada ó fenicada (1 hora, con la cara de la preparación vuelta hacia abajo y colocada sobre la solución colorante de modo que sobrenade ó bien durante 10 minutos con la solución sobre el cubre, reponiéndola si se evapora.)

La introducción de la materia colorante en las esporas se efectúa mejor, pasando 30-40 veces la preparación por la llama, como al fijar (v. pág. 52.)

2. Lavar con alcohol + 3 % de HCl (ó con 1 % de H₂SO₄ ó 3 % de HNO₃) durante 1/2-1 minuto.
3. Segunda coloración con azul de metileno, en solución acuosa ó alcohólica.
4. Enjuagar con agua, observar en ésta ó desecar, montar en bálsamo. Esporas color rojo, bacilos azules.

Es preferible por ser más seguro, el método *b)* de *Möller*.

1. Tratar el cubre-objetos (después de fijar) de 5 segundos hasta 10 minutos, con ácido crómico al 5 %. Esta duración debe ensayarse en cada especie bacteriana.
2. Enjuagar con agua.
3. Teñir con fuchsina anilizada ó fenicada, durante un minuto y en caliente.
4. Decolorar con H₂SO₄ al 5 % durante 5 segundos.
5. Enjuagar con agua.
6. Teñir por contraste con azul de metileno, lavar etc.

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

Según *Aujeski* (Ctrbl. f. Bakt. Abt. I, Tom. 23 página 329) se sumergen los frotos desecados al aire y no fijados, en HCl al 1/2-0% en caliente, durante 3-4 minutos, se fijan y se tiñen como en los nr. 3-6 anteriores. Según *Orszag* (C. B. I. Tom. 41. pág. 397). Se pasa el material bacteriano, á una gota de una mezcla de 4 partes de sol. de salicilato de sosa al 1/2 % y 1 de ácido acético al 5 % se deja secar al aire, se fija en la llama y se trata como en *b)* 3-6 (en el nr. 4 emplear H₂SO₄ al 1 % ó HNO₃ al 3 %).

Coloración de cirros

Se toma el material bacteriano de cultivos sólidos, no licuados (preferibles en particular, los cultivos jóvenes en agar) y se observa en gota suspendida si presentan movilidad. Las bacterias que se examinan, deben estar aisladas cuanto sea posible y contener interpuestos pocos fragmentos del medio de cultivo, lo cual se consigue del modo siguiente: Se disponen seis cubre-objetos perfectamente limpios y se coloca una gota de agua sobre cada una de ellos, se pasa un poco de materia al primero, de este un indicio al segundo, de éste al tercero y así sucesivamente. O bien: Se pone un poco de materia en una gota de agua, sobre un porta-objetos y de éste se pasa un indicio á una gota grande de agua, á la que se han añadido una ó dos öses de solución de ácido ósmico; con esta gota se preparan los cubre-objetos. O bien: se pone en un tubo de ensayos con solución de NaCl al 0,8 0/0, una pequeña cantidad de bacterias, se pasan gotas de éste á los cubres, se extiende sin frotarlo mucho, se deja desecar al aire y se fija por medio de pasos á la llama.

Los cubres deben estar *perfectamente limpios*.
(Modo de limpiar v. pág. 7.)

A. Coloración de cirros según Loeffler

1. Poner en maceración los cirros sobre un cubre-objetos, en la solución mordiente que se indica luego. Calentar hasta que se desprendan vapores, $\frac{1}{2}$ -1 minuto.
2. Lavar la preparación con un chorro fuerte de

agua. Separar cuidadosamente el mordiente en los bordes (eventualmente con papel de filtro) y en la superficie.

3. Lavar con alcohol, hasta que sólo aparezca teñida la porción donde están los microorganismos.
4. Teñir con fuchina anilizada, (Es conveniente añadir á la solución preparada según la pág. 62 b., 1 % ó más de una sol. de NaOH al 1 %, hasta que aparezca un precipitado en suspensión ó sea hasta que aparezca un enturbamiento—preparada de nuevo cada vez!) en caliente.
5. Lavar con agua.

Como mordiente, se emplea una mezcla de 10 cc de solución de tanino al 20 %, 5 cc de sol. de sulfato ferroso saturada en frío, 1 cc de solución acuosa ó alcohólica de fuchina (ó violeta de metilo). Este mordiente es muy apropiado, según Loeffler, para teñir los cirros del *Spirillum concentricum*; para el b. tifoso es necesario una adición de 1 cc de NaOH al 1 %, por cada 16 cc de mordiente, para el b. subtilis 28-30 gotas, y para el b. *ædematis malignae* 36—37 gotas de la sol. alcalina. Para teñir los cirros del v. del cólera y los del *Spirillum rubrum*, deben añadirse, por cada 16 cc de mordiente, $\frac{1}{2}$ -1 gota y 9 gotas respectivamente, de sol. de H_2SO_4 preparado como la sol. alcalina anterior.

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

Se evita la formación de precipitados en la preparación, lavando con mucho cuidado. Es también conve-

niente al macerar y teñir, poner un pedazo de papel de filtro sobre la preparación y encima de él la solución colorante.

Modificación de *Bunge*:

1. Macerar con la siguiente solución: 3 partes de solución acuosa concentrada de tanino, 1 de cloruro férrico al 1: 20 de agua. Por cada 10^{cc} de esta mezcla, se añade 1^{cc} de solución acuosa saturada de fuchina. El mordiente debe dejarse en reposo por lo menos algunos días. Antes de usarla, se le añade agua oxigenada gota á gota, hasta que esté de color rojo pardo (próximamente 14 gotas de H₂O₂ al 3^o%, por cada 5^{cc} de mordiente). Luego se filtra la solución sobre los cubreobjetos y debe hacerse actuar (en caliente) de 1-5 min. (El mordiente adicionado de H₂O₂ se conserva á propósito para el uso, muy corto tiempo.)
2. Lavar con agua.
3. Secar entre papeles de filtro.
4. Teñir con violeta de genciana fenicada (véase página 68 *a*) calentando ligeramente.
5. 1/2-1 min. en ácido acético al 1^o% (puede omitirse.)
6. Lavar con agua, desecar, montar en bálsamo.

Puede emplearse como mordiente para todas las bacterias, sin necesidad de adición alguna. También se tiñen las cápsulas, especialmente si antes que el mordiente, ha actuado el ácido acético al 5^o%, 1/2-1 min. lavando luego con agua.

Modificación de *Coerner-A. Fischer*.

1. Macerar con la siguiente solución, durante 1 minuto y en caliente, pero sin hervir; 2 gr. de tanino, 20 gr. de agua, 4^{cc} sol. de sulfato ferroso (1: 2), 1^{cc} sol. alcoholica saturada de fuchina.

2. Lavar con agua.
3. Teñir con fuchina anilinada ó fenicada ó con sol. acuosa saturada de fuchina.
4. Lavar con agua, desecar, bálsamo.

Aplicable á todas las bacterias sin otra adición ulterior.

B. Coloración do cirros según van Hermengen

1. Se tratan los frotos durante $\frac{1}{2}$ hora en frio ó 5 minutos á 50-60°, con una mezcla de: 1 parte de ácido ósmico al 2% y 2 partes de sol. de tanino al 10-25%, á la que se añaden 4-5 gotas de ácido acético%. La mezcla debe estar preparada algunos dias antes de usarla.
2. Lavar con agua destilada.
3. Lavar con alcohol absoluto.
4. Humedecer en sol. de AgNO_3 al 0,25—0,50 (-1,0)%, en agua ó alcohol absoluto, durante algunos segundos.
5. Sin lavar, se tratan por la siguiente solución: ácido gallico 5,0, tanino 3,0 acetato sódico fund. 10,0 ag. dest. 350, durante algunos instantes.
6. Repetir el núm. 4, moviendo continuamente la preparación, hasta que el líquido empiece á ennegrecerse.
7. Lavar con mucha agua. Si la coloración no aparece bastante intensa repetir desde el 5 al 7. Si es demasiado fuerte, tratar un instante con sol. de cloruro de oro al 1:3000, lavar cuidadosamente, y dejar la preparación algunos dias en presencia de la luz.
8. Secar, montar en bálsamo.
Las bacterias quedan pardo negruzcas, los cirros negros.

El procedimiento puede aplicarse del mismo modo á todas las bacterias movibles. Es preferible operar con la luz del día.

C. Coloración de cirros según Zettnow

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

1. Preparación de los frotos como en el procedimiento del a. ósmico (v. pág. 75).
2. *Maceración.* Fijar los cubres á la llama, colocarlos con la cara preparada vuelta hacia abajo, en pocillos de cristal, con abundante mordiente y ponerlos sobre una plataforma de hierro caliente á 100°, durante 5-7 min. Preparación del mordiente: Se disuelve 10 de tanino en 200 de agua caliente á 50-60°, se les añade 36-37 cc de una solución de 2 gr. de tártaro estibiado en 40 de agua, y se calienta hasta tener disuelto el precipitado. Si el mordiente al enfriarse se enturbia mucho (se pone lechoso—hacer la prueba en tubo de ensayos) se añade un poco de tanino, si por el contrario queda transparente, se le añade 1 cc de sol. de Tárt. El mordiente no debe formar sedimento, y calentándolo ha de quedar del todo transparente. Añadiendo un poco de timol se hace más inalterable. Debe emplearse en caliente y del todo claro.
3. Se dejan enfriar los pocillos hasta que el mordiente empiece á enturbiarse, luego se lavan con agua, con mucho cuidado.
4. Se ponen sobre el porta-objetos 3-4 gotas de sol. de etilaminato de plata y se calienta hasta que desprenda muchos humos y que los bordes de la preparación (sólo los bordes!) se pongan

negros. *Etilenaminato de plata*, preparación: 2-3 gr. de sulfato argéntico, se agitan fuertemente en 200 de agua, hasta obtener una solución saturada. Una cantidad conveniente de esta + ag. $\bar{a}a$, se mezcla en un tubo de ensayo con sol. de etilamina (comercial) al 33%, hasta que el precipitado que empieza á formarse, se disuelve bien, de nuevo. Inalterable, se tiñe lentamente en pardo; sin importancia.

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

VI

Medios de cultivo y métodos de cultivo y coloración especiales

**para las especies más importantes de microorganismos
patógenos y algunos otros**

1. Bacillus Anthracis (Carbunco)

Se desarrolla sobre todos los medios de cultivo usuales, licua la gelatina, se tiñe fácilmente, toma el Gram. Inmóvil, esporígeno, con mas rapidez en la estufa, no forma esporas á menos de 16^o, ni en el cuerpo de los animales.

Se reconoce en los cuerpos, por medio de cultivos y de inoculaciones en animales (inyecciones subcutáneas en ratas y cobayas). Cuando se opera con material putrefacto, las inoculaciones resultan algunas veces negativas y los cultivos en placas dan resultados positivos. En la sangre de los animales, en la que no puede investigarse en seguida el b. anthracis, se conserva este largo tiempo en condiciones de vitalidad, desecándola en capas densas sobre vídrios.—Para reconocerlo en el pelo ó otras materias semejantes, se lavan los pelos con caldo alcalino, se calienta este $\frac{1}{2}$ hora á la temperatura de 80^o (á la cual sobreviven las esporas del b. a.) se centrifuga y se inyecta el sedimento, ó se siembra.

Coloración de cápsulas, según los métodos de la pág. 72.

Además, se ponen de manifiesto aquéllas, tiñendo con safranina (se disuelven 3 gr. en 100 gr. de agua destilada casi hirviendo, después de frío, se filtra) en caliente, ó bien se tiñe con violeta de genciana — formalina (sol. saturada en frío del colorante, en formalina, filtrada; los frotos sin fijar se tiñen en frío en 10 segundos). Observar en agua. La formación de cápsulas en el b. a., pueden ayudar algunas veces á diferenciarle de otros bacilos análogos, en los cadáveres de animales en descomposición, nunca basta sin embargo por si solo, sin obtener resultados positivos en cultivos é ino-
culaciones en animales.

Obtención de filamentos esporulados: Se raspan cultivos en agar ó en patata, en los cuales el microscopio ponga de manifiesto las esporas perfectamente desarrolladas y se desmenuzan en agua estéril. Se mojan hebras de seda de 1-2^{cm} esterilizadas, (seda Turner nr. 4 y 5) con la varilla que sirvió para desmenuzar (ó se sumergen directamente en el cultivo desmenuzado.) Se dejan dentro de cápsulas dobles en la obscuridad, hasta que se sequen, y luego se introducen en tubos de ensayo, también en sitio obscuro. (debe tenerse mucho cuidado al recogerlos. Es peligrosa la inhalación de esporas.) Se emplean como objetos de prueba (testaobjetos) en los ensayos de desinfectantes, v. pág. 48 y 49 Nr. 9 y 10. Resistan la mayor parte 2-5 min. á 100° (vapor.)

2. Bacilo de la tuberculosis (*B. Koch*)

Entre los medios de cultivo usuales son aplicables al b. T.: el suero sanguíneo (preferentemente obtenido por sangría directa); el agar glicerinado (4 % de glicerina, optimo); patata glicerinada (cuñas véase pág. 26, cocidas en agua glicerinada al 4 %, y separadas luego de ésta) caldo glicerinado (se desarrolla solo en partículas que sobrenadan en la superficie). Cultivos á 37°; desarrollo muy lento. No se desarrolla sobre gelatina, agar peptonado, etc., ni á la temperatura ambiente. Inmóvil.

Se emplean como medios especiales de cultivo (desarrollo abundante ya á los 8 días): Agar, Heyden de Hesse (véase pág. 86) y medios á base de seso según Ficker: Se mezclan sesos finamente picados con agua \overline{aa} , se calienta á ebullición durante $\frac{1}{2}$ hora, agitando continuamente, se cuela luego, hasta que quede en el colador una ligera papilla. Se mezcla ésta sin neutralizar, con solución al 2 % de agar, en agua destilada \overline{aa} , se le añade 3 % de glicerina, se esteriliza, etc. Se reparte en tubos, se mezcla bien y se coagulan rápidamente antes que se separen en capas el seso y el agar.

Cultivos del bacilo procedente de los tejidos, esputos, etc., por medio de inoculaciones animales (pág. 88) ó por siembra directa (en presencia de otras bacterias, según B 1, *a* y *b*, pág. 86).

Métodos de coloración para el b. tuberculoso.

Los b. tuberculosos se tiñen difícilmente, pero una vez teñidos, retienen muy fuertemente el colorante. En los siguientes métodos se reconoce el b. T. (y algunos

otros parecidos los llamados *ácido-resistentes*; para su diferenciación, véase pág. 89) por el primer colorante, mientras que las demás bacterias se tiñen con los colorantes empleados para el contraste.

a) Muy recomendables:

Para frotos:

1. Teñir con fuchina anilizada ó fenizada durante 2 minutos, en caliente.
2. Decolorar 2-5 segundos con H_2SO_4 al 5 % ó con HNO_3 al 25 %.
3. Lavar con alcohol al 70 % hasta que la preparación aparezca incolora (si esto no se efectúa bastante rápidamente, se repiten los números 2 y 3.)
4. Teñir con solución acuosa saturada de azul de metileno, ó con azul de metileno Loeffler (página 62) 1+3 agua, 5-10 segundos.
5. Lavar con agua.

Para cortes:

1. Teñir con fuchina anilizada (no debe emplearse fenizada porque las preparaciones aparecen sucias), 15 minutos hasta 24 horas.
2. Decolorar 10 segundos, con H_2SO_4 al 5 % ó con HNO_3 al 20 %.
3. Lavar con alcohol al 70 % hasta que la preparación aparezca incolora (para obtener ésto más deprisa se puede repetir, rápidamente, 2 ó 3 veces el tratamiento.)
4. Teñir con azul de metileno, ó mejor con el de Loeffler, (pág. 62.) 1+3 agua, 2-5 minutos.
5. Lavar con a. acético al $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ %.
6. Deshidratar en alcohol absoluto.
7. Aclarar en aceite de cedro.

B. tuberculoso rojo y las demás bacterias azules.

Para frotos y cortes puede emplearse asimismo en el nr. 1, violeta de genciana anilizado y luego en el 2.

HNO₃ al 25 % y en el 4 soluciones diluídas de fuchina-safranina ó de pardo Bismarck. En este caso el b. tuberculoso aparece teñido en azul y los tejidos en rojo ó pardo.

b) *Procedimiento de Fränkel y Gabbet.*

Para frotos:

1. Teñir con fuchina anilinada ó fenicada 2 minutos, en caliente.

2. Decoloración y coloración de contraste simultáneo, empleando una mezcla de 30 de alcohol, 50 de agua, 20 de HNO₃ y azul de metileno á saturación (ó bien 10 de H₂SO₄, 30 de agua destilada + azul de metileno á saturación.)

3. Lavar con agua ó bien:

1. Teñir con violeta de genciana anilinada ó con violeta-metilo 2 minutos, en caliente.

2. Decolorar y teñir por contraste (1 ½-2 minutos) empleando solución de 70 de alcohol, 30 de HNO₃ + pardo Bismarck ó saturación.

3. Lavar con agua.

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

Investigación del b. tuberculoso en los esputos

(Investigaciones parecidas en exudades, orina, leche y semejantes):

A.—En el *análisis microscópico* se empieza por hacer una preparación ordinaria por *frotamiento*. En el análisis de esputos, se extiende la secreción sobre un plato barnizado de negro (ó en una cápsula de vidrio con el fondo negro) y se toma una partícula de la parte

del esputo que aparezca más sólida, preferentemente los grumos amarillos purulentos, y se coloca sobre un cubre-objetos, se extiende uniformemente con la öse ó bien se aplasta con otro cubre ó con un porta-objetos y se fija y tiñe según uno de los antes citados métodos. La orina, los exudados, el líquido cerebro-espiral obtenido por punción lumbar, etc., se centrifugan y se hacen preparaciones con el sedimento. Una preparación podrá considerarse bien teñida, únicamente cuando á excepción del b. T. nada (exceptúase, á lo más, una ligera coloración en los epitelios planos ó en los contornos celulares) más queda teñido en el color empleado para su reconocimiento.—Si después de examinar varias preparaciones, no se encuentra bacilo ninguno, se emplean los procedimientos para obtener germinación (B) ó se hacen ensayos sobre animales (C).

B. *Procedimientos para germinación ó multiplicación:* Pueden considerarse como tales:

1. *Procedimientos biológicos:* Multiplicación rápida del b. T sobre medios de cultivo apropiados.

a) Siembras sobre Agar-Heyden, según *Hesse*. Se disuelven 5 gr. de *alimento* Heyden en 50 de agua destilada, en un mortero y la solución obtenida, se añade á otra de 5 de NaCl., 30 de glicerina, 10-20 de agar, 2 de solución normal de Na_2CO_3 , en 950 de agua destilada, se hierve, agitándolo, durante 15 minutos, se filtra en caliente. Se reparte después de esterilizada en cápsulas Petri, se deja solidificar y se extiende una partícula (lenteja) del esputo (que en caso necesario se lava varias veces con agua estéril) en la superficie, en pequeños granos aislados. En este medio de cultivo, crecen muy rápidamente los bacilos á 37°, son abundantes ya á las 6-7 horas y á los 2-7 días forman colonias apreciables á simple vista (para preservar las placas de la desecación deben colocarse en cámara húmeda,) mien-

tras que el crecimiento de las demás bacterias del esputo es muy difícil. Se observa en preparaciones obtenidas por aplastamiento. Es un excelente procedimiento para un rápido diagnóstico, en esputos pobres en b. T. Para obtener cultivos puros es preciso *resembrar*. Se puede mezclar también el esputo con 5 veces su volumen, de la solución nutritiva de Heyden antes citada (sin añadir agar) y tenerlo 24 horas en la estufa á 37°, con lo cual se desarrollan los b. T, y luego se tratan según el procedimiento de sedimentación descrito, en la página 88 c. (Jochmann).

b) Siembras en agua glicerizada + agar según Hesse. (Ctrlbl. f, Bakt. abt. I.or. 35. pág. 386). 1 de agar, 3 de glicerina y 96 de agua destilada se hierven, se filtran y se reparten en tubos de ensayo que no contengan álcali (de Schott-Jena), 20 c. c. en cada uno y se esterilizan. Al contenido de los tubos previamente licuado, se le añade solución $\frac{N}{10}$ de potasa, hasta que tenga con el papel rojo de tornasol, reacción idéntica á la del esputo analizado; luego se vierte en cápsulas Petri. Sobre la superficie solidificada de la placa, se coloca una partícula del esputo del tamaño de una lenteja, desprovista cuanto sea posible de moco, y se extiende en pequeños grumos. Al cabo de 1-2 días de tenerle en la estufa á 37°, pueden reconocerse los b. T. en preparación por compresión.

2. *Procedimientos de sedimentación*: Homogeneización del esputo, con lo cual se separan los b. T. por sedimentación ó bien se recogen por centrifugación (sólo debe emplearse el reconocimiento al microscopio, no son posibles las siembras).

a) Según *Biedert. Mühlhauser-Czaplewski*.—Se mezcla el esputo con 2-4 veces un volumen de solución al 0,2 % de NaOH y se agita fuertemente durante 1 mi-

nuto, en un tubo de ensayo cerrado con tapón de goma. En caso de que no se fluidifique regularmente, se añade más NaOH y se agita de nuevo convenientemente, hasta que el líquido esté homogéneo. Se calienta luego hasta ebullición, en cápsula de porcelana, removiéndolo. Se añaden 1-2 gotas de fenolftaleina y luego gota á gota, ácido acético al 5 % agitando fuertemente, hasta que el color rojo desaparezca casi (no más!). Luego se deja depositar en una copa ó se centrifuga, después de añadirle el doble de su volumen de alcohol de 96 %; con el sedimento se hacen preparaciones teñidas.

b) Según *Dahmen*. Se calienta el esputo 15 min. en corriente de vapor (autoclave, esterilización simultánea), se deja sedimentar ó se centrifuga, se desmenuza el sedimento en un mortero de ágata y con él se hacen preparaciones.—Basta calentar á 70°, agitando frecuentemente.

c) Según *van Ketel*. Se mezclan en un frasco de 100 cc. de cuello ancho, 10 cc. de agua, 6 cc. de ácido fénico líquido y 10-15 cc. de esputo, se agita bien el conjunto, se añade agua hasta 100, se deja sedimentar en una copa cónica ó se centrifuga como en *a*. Las preparaciones deben lavarse con alcohol + éter— $\overline{a a}$ — antes de teñirlas.

d) Según *Spengler*. Se mezcla el esputo con agua tibia, alcalinizada con solución de Na_2CO_3 $\overline{a a}$, se agita con 0,1-1,0 gr. de pancreatina en polvo y se pone en la estufa á 37°. En seguida ó al cabo de 2-3 horas se añade un cristal de ácido fénico de 0,2-1 gr. Tan pronto se ha formado sedimento, se separa el líquido que sobrenada y se examina aquél. En caso de que el sedimento aparezca demasiado grande, se añade más agua alcalina y pancreatina, etc. No debe digerirse demasiado. La reacción debe ser siempre alcalina.

C. *Ensayos en animales*. El procedimiento es más

lento que los *A* y *B* pero mucho más seguro. Se efectúan inyecciones subcutáneas (preferentes cuando el material inyectable, contiene abundantes bacterias distintas del b. T.) ó intraperitoneales, con el material que contiene b. T.; mueren los cobayas en 4-8 semanas la mayor parte, con abundantes nódulos tuberculosos en el hígado, en los pulmones, en el bazo y se nota caseificación de los ganglios linfáticos. En los nódulos tuberculosos, que siempre se examinan al microscopio, para evitar confusiones con enfermedades análogas, hay abundantes b. T. Para efectuar siembras se comprimen los nódulos entre dos porta-objetos estériles y se siembran muchos fragmentos, del tamaño de una cabeza de alfiler por lo menos, sobre suero sanguíneo coagulado. Siembra v. pág. 83. El desarrollo se hace notable á los 8-14 días.

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

Si los cobayas inoculados con b. T. se matan á las 2 ó 3 semanas de la inoculación, se encuentran en la mayor parte de los casos los ganglios linfáticos y el sitio de la inyección caseificados y en los órganos internos, hay nódulos tuberculosos notablemente desarrollados. Para acelerar el diagnóstico puede matarse el animal inoculado al cabo de dicho tiempo, sin aguardar á que se muera.

3. Bacilo del esmegma

Se encuentra en las secreciones prepucial y vulvar, en la orina (las últimas porciones de ésta, extraídas con la sonda después de limpiar el aparato genital externo, están casi exentas de bacilos) en los pliegues del ano, en el cerumen de las orejas, y circunstancialmente en otras regiones del cuerpo. Más cortos y finos que el b. T., muy abundantes, situados en los epitelios. El b. T. en la tuberculosis renal, en la mayor parte de los casos, se encuentra por el contrario reunido en haces ó montones sin ninguna célula.

Ensayar las siembras sobre suero.

Coloración: Es ácido-resistente, como el b. T. y el b. de la lepra. Para diferenciarlo del b. T., ante todo los ensayos en animales (v. pág. 88 en C) ó también el siguiente procedimiento de coloración:

Según Honsell:

1. Teñir con fuchina fenicada, 2 minutos, á ebullición.
2. Lavar con agua, desecar.
3. Tratar con una mezcla de alcohol absol. 97. + HCl 3, durante 10 minutos.
4. Lavar con agua.
5. Coloración de contraste mediante solución alcohólica saturada de azul de metileno + agua. B. T. se tiñe en rojo, el del esmegma no.

4. Bacilo de la lepra

Hasta ahora no ha sido posible el cultivarlo. Se puede ensayar la germinación de fragmentos de nódulos leprosos, en solución de NaCl al 0,8 %.

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

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

2. Decolorar $\frac{1}{4}$ de min. con alcohol 10 + HNO₃ 1.

3. Lavar con agua. Para los cortes en lugar de éste, alcohol absoluto, y aceite de cedro.

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

5. Bacilo del muermo

Siembras en suero, agar y patata (en ésta produce un cultivo rojo-pardo, típico) á la temperatura fisiológica normal.

Cultivos puros, mediante el pus de hombre ó animales muermosos, se obtienen preferentemente inoculando animales. La rata gris muere á los 5-8 días y los

cobayas á los 14 días de la inoculación subcutánea ó intraperitoneal; los nódulos muermosos en los órganos internos, contienen los bacilos en cultivo puro. (N. B. El edema y supuración de los testículos, producidas por la inyección del material muermoso en la cavidad abdominal de un cobaya macho y que se efectúa á los 2 días de la inyección, si existen el b. del muermo (el llamado signo de *Strauss*), no es signo patognomónico del todo característico para el muermo; también otros bacilos que se encuentran en procesos parecidos al muermoso, lo ocasionan.) Debe empezarse siempre por los ensayos microscópicos y de cultivos, eventual. Efectuar la prueba de la aglutinación (v. *Kleine Zschr. für Hyg.* 42 pág. 183). Diagnóstico después de la muerte. Examen de la aglutinación de bacilo por el suero sanguíneo (v. *Ficker Hyg. Rdsch.* 1905 pág. 649.)

Coloración con el azul de metileno de *Loeffler* (pág. 62) ó según el método de *Loeffler* citado en la pág. 97, según el método de *Nicolle*. (pág. 64 y 65 e. y f.) No toma el Gram.

Métodos especiales de coloración:

a) Según *Loeffler*:

α) En frotos:

1. Teñir con azul de metileno de *Loeffler* (v. página 62 a) ó con solución acuosa de genciana anilina + solución HOK. 0,01 % a a, 5 minutos.

2. Lavar rápidamente con ácido acético al 1 %, teñido en color de vino del Rhin, con solución acuosa de tropeolina 00 (nombre de la materia colorante.)

3. Lavar rápidamente con agua.

β) En cortes:

1. Sumergir el corte durante algunos minutos, en solución de potasa al 0,01 %.

2. Teñir como en a 1, durante 30 minutos ó más.

3. Lavar rápidamente con 10 de agua destilada

+ 2 gotas de ácido sulfuroso concentrado y 1 gota de ácido oxálico en solución al 5 %.

4. Deshidratar en alcohol absol.; luego en aceite de cedro, etc.

b) Doble coloración según *Unna*:

1. Desecar el corte sobre el porta-objetos y teñir con azul de metileno de *Kühne* (v. pág. 63) durante 10 minutos.

2. Lavar con agua.

3. Teñir durante 15 minutos en solución acuosa saturada de tanino + solución acuosa al 1 % de fuchina ácida $\overline{a a}$ (N. B. la fuchina ácida es una materia colorante especial.)

4. Deshidratar en alcohol. Aclarar en esencia de bergamota. Bacilos y núcleos azules. Tejidos rojizos.

6. Streptobacilo del chancro blando

Siembras sobre agar-sangre (pág. 154, preferentemente sangre humana) posibles (no siempre dan resultado.) Las colonias se separan íntegras y son difíciles de disgregar. En el agua de condensación, se forman largas cadenas. Los cultivos mueren á los pocos días.

La coloración de frotos se efectúa por los métodos generales, no toma el Gram, en los cortes se ha de decolorar con *cuidado*. Dán muy buenos resultados, el método del tanino de *Nicole* (pág. 64 e) y el método de *Unna*:

1. Teñir durante 2 minutos con solución polícroma de azul metileno (preparado por *Grübler*, Leipzig).

2. Lavar con agua.

3. Colocar los cortes sobre una espátula, desecar con papel de fieltro.

4. Diferenciar con éter-glicerina (de *Glübler-Leipzig*), algunas gotas en una capsulita llena de agua, 1-2 minutos.
5. Lavar con agua (cuidadosamente).
6. Desecar sobre la espátula con papel de filtro.
7. Alcohol absoluto, esencia de bergamota, bálsamo Canadá.

7. Bacilo diftérico

Se producen cultivos á temperaturas superiores á 20°, más rápidamente á la temperatura fisiológica. Crecimiento óptimo sobre el suero de *Loeffler* (v. página 24), especialmente cuando ha sido preparado con sangre de carnero. Desarrollo limitado, con producción de formas bacterianas menos características, sobre el agar, agar glicerinado y demás medios de cultivo que luego se citan.

Para su coloración, está indicada principalmente la solución alcalina de azul de metileno de *Loeffler* (página 62). Toma el *Gram*. (No decolorar mucho!) Inmóvil.

Diagnóstico de la difteria

Para la toma del material que debe analizarse, de la garganta v. pág. 155. La germinación debe obtenerse por siembras fraccionadas (v. pág. 36), en estría, sobre suero de *Loeffler*, en tubos ó cápsulas de Petri (v. pág. 24). NB.; antes de utilizar una partida de suero, debe ensayarse en algunos tubos de la misma el valor nutritivo, sembrándolos con cultivos puros de b. diftérico! Germinan á la temperatura fisiológica. (En caso necesario pueden llevarse los tubos en el bolsillo interior del vestido). En lugar del suero de

Loeffler, pueden emplearse también los siguientes medios de cultivo:

1. *Agar glicerinado*. Las colonias quedan pequeñas, por esto se reconocen con menos facilidad. Es posible en ellos la confusión del b. diftérico, con otros muchos pseudo bacilos parecidos á aquél.

2. *Albuminato alcalino-agar* según *Deycke*.

Se puede adquirir albuminato alcalino de la casa *Merk* (100 gr. 11 Mk) ó prepararlo según la pág. 131. En 1000 de agua destilada se disuelven 10 gr. de aquel + 10 gr. de peptona, 5 de NaCl., 20 gr. de agar y 50 gramos de glicerina. Se neutraliza cuidadosamente con HCl concentrado, luego se alcaliniza añadiendo solución de Na_2CO_3 cristalizado al $\frac{1}{3}$ ‰. Sobre este medio se desarrolla bastante bien el b. diftérico, pero también los pseudobacilos. Si el medio es suficientemente alcalino, no se desarrollan los streptococos.

3. *Agar-suero de Tochtermann*.

Se disuelve en agua, agar al 2 ‰ + 1 ‰ de peptona, 0,5 ‰ de NaCl, 0,3—0,5 ‰ de glucosa se filtra y se le añade suero de sangre de carnero $\frac{a}{a}$ ó en la relación de 3 de suero por 2 de agar, se hierve el conjunto $\frac{1}{4}$ - $\frac{1}{2}$ hora, se filtra, se reparte en tubos y se esteriliza (no debe hervirse más de 1-1 $\frac{1}{2}$ horas, porque sino disminuye su valor nutritivo!)—Colonias grandes, fácilmente reconocibles, pero los bacilos, son muy semejantes en la forma á los pseudobacilos.

El suero de *Loeffler*, además de otras, tiene sobre los anteriores medios de cultivo, la ventaja de que en él se desarrolla el b. diftérico rápidamente, abundante y en formas características, diferenciándose del bacilo de *Hoffmann-Loeffler*. (pseudobacilo de la garganta) y también del b. xerosis (pseudobacilo de los ojos) por su forma y particularmente por el tamaño de las colonias (el b. diftérico dá colonias mucho mayores!)

El examen de los cultivos á las 6 horas de sembrados, dá resultados positivos. En los tubos, deben hacerse frotos con gruesos fragmentos de superficie y en las placas sembradas, por compresión y se examina además el agua de condensación. Teñir con el azul metileno de *Loeffler* (pág. 62). Se reconoce el b. diftérico en sus formas típicas (bacilos teñidos en porciones variables, en parte sin teñir, formas en maza, etc.) Cuando no se ha encontrado ningún b. diftérico, después de varias preparaciones, conviene repetir frecuentemente el examen (hasta 48 horas después de la siembra). Al cabo de 12-16 horas, las colonias del b. diftérico se hacen típicas y fácilmente reconocibles (hemisféricas, blanco amarillentas, húmedas); entonces se hacen preparaciones de las colonias sospechosas. Además es recomendable:

La coloración de los corpúsculos polares, según M. Neisser (Hyg. Rdsch. 1903, Nr. 14):

1. Teñir durante 1 segundo (ó más) con una mezcla de 2 partes de solución *a*, y 1 parte de solución *b*. La solución *a* formada por 1 de azul de metileno en polvo, 20 de alcohol absol., 1000 de agua destilada, 50 de a. acético glacial. La solución *b*: 1 cristal violeta Höchst. 10 de alcohol absol. y 300 de agua destilada.

2. Lavar con agua y en seguida,

3. Teñir por contraste con crisoidina (1 parte disuelta en 300 de agua hirviendo y filtrado) durante 3 segundos.

4. Lavar con agua.

Este método de coloración, puede emplearse para teñir frotos hechos con el material analizado, así como para teñir cultivos de 14-20 horas sobre suero. Los bacilos diftéricos, quedan teñidos en pardo, y en uno de los polos ó en ambos (y á veces en el centro también) presentan corpúsculos azules, mientras que los demás

bacilos parecidos al diftérico, en las condiciones que éste, no presentan corpúsculos teñidos todavía. El método no es absolutamente seguro, puesto que algunas veces, aunque raras, los b. pseudodiftéricos (b. xerosis y semejantes) presentan también los corpúsculos como el b. diftérico y además este último tarda muchas veces en dar corpúsculos y aún por excepción no los da casi.

Loeffler (D. m. W. 07. Nr. 5) emplea la coloración siguiente:

1. Teñir en frío, con sol. acuosa de borax (2,5 %)— azul de metilenc (1 %) 40 partes + azul de metileno policromo de Unna (Glübler-Leipzig) 10 + 50 de sol. acuosa de bromoeosina extra A. G. (Höchst), al 0,05 %.

2. Decolorar con tropeolina 00 (sol. acuosa saturada) 5 + 0,5 de ácido acético + 100 de ag. dest. Protoplasma bacteriano azul pálido, corpúsculos polares, negro azulados. Otros métodos (v. C. B. I. Tom. 38, página 359).

Cuando existen dudas sobre la presencia del b. diftérico ó de pseudobacilos, debe tratarse el caso *terapéuticamente*, como si seguramente fuera difteria (inyecciones de suero curativo por tanto, en caso de que esta precaución no se haya tomado en seguida) y bacteriológicamente más adelante efectuando siembras con el b. sospechoso. Si mediante la siembra directa no se obtienen colonias aisladas, se distribuye una porción del material sospechoso, tomada de un sitio en el que se ha comprobado con el microscopio, la presencia de bacilos numerosos, agitándolo en un tubo con caldo estéril, con el cual se efectúan luego las siembras fraccionadas sobre suero (pág. 37), de éste debe aislarse tan pronto como sea posible. Frecuentemente, en la segunda serie de cultivos, se hace ya fácil el diagnóstico diferencial entre el b. diftérico y los pseudo diftéricos, á causa del gran número de colonias en los culti-

vos y de bacilos en las preparaciones. Si todavía ahora se tuviesen dudas, siguen:

a) Los *ensayos sobre animales*. Una porción de cultivo puro sobre suero (de 1-2 días á 37°), tomada con una öse grande de platino ó bien 0, 2-1. cc. de cultivo en caldo del mismo tiempo, se inyectan subcutáneamente en el pecho de un cobaya de unos 250 gr. (Técnica v. pág. 165). Si se trata de un b. diftérico virulento, el animal enferma al cabo de un día, presentando abundante infiltración el sitio inyectado, y muere, en la mayor parte de los casos, á los 2 días. (Los órganos quedan estériles, las glándulas suprarrenales sanguinolentas, secreción pleural abundante y serosa, y en el sitio de la inyección presenta siempre infiltración abundante y frecuentemente hemorrágica.) Inyectando la misma cantidad de cultivo de b. diftérico, mezclado con abundante cantidad de suero curativo antidiftérico (0, 2. cc. de suero de 200 unidades ó más), el animal queda vivo, y el sitio de la inyección no presenta ninguna ó casi ninguna reacción. Inyectando en las mismas condiciones antedichas, dosis de cultivos de b. pseudodiftéricos, iguales de los de b. d., se produce á lo más un pequeño edema en el sitio de la inyección (aunque esto es muy raro) y el animal no muere; en caso de que reaccionen, se repite la inyección con mezcla de suero antidiftérico.

b) Contribuye también al diagnóstico diferencial, el ensayo de la reacción: Se siembran tubos de ensayo, que contengan unos 10 cc. cada uno de agua de carne esterilizada (véase pág. 13) preparada con carne fresca. Los bacilos diftéricos producen ácidos (equivalentes, á las 24-48 horas á 37°, próximamente á 0,35-1, ó de $H_2SO_4 \frac{N}{10}$, (indicador fenolftaleina); el pseudobacilo de *Hoffmann-Loeffler* forma álcali (que aproximadamente equivale á 0,2—0,4 de $NaOH \frac{N}{10}$). Las bacterias del gru-

po del b. xerosis producen ácidos, algunos de ellos en tanta cantidad como los verdaderos b. diftéricos, por esto no es posible diferenciarlos por medio de este ensayo. (Lo mismo ocurre en el caldo; á causa del color amarillo del medio se hace difícil la valoración.)

Toxina diftérica: Está contenida en los líquidos de cultivo. Sembrando el b. diftérico en matraces de caldo con mucha superficie y poco espesor. Empleando caldo preparado con carne vieja, debe añadirsele un poco de creta pulverizada. Después de 1 hasta 4 semanas, se filtra para separar los gérmenes y al líquido filtrado que contiene la toxina, se le adiciona $\frac{1}{2}$ % de ácido fénico para conservarlo (designase como normal, la toxina de la cual 0,01 cc. es suficiente para matar un cobaya de 250 gr., inyectado subcutáneamente, á los 4 ó á lo más á los 5 días.)

Inmunización, v. pág. 169.

Suero antidiftérico, se prepara con animales inmunizados en alto grado. Se conserva con un 0,5 % de ácido fénico. Suero normal, es el que tomado en proporción 0,01 de cc. basta para neutralizar en el cuerpo de un cobaya, una cantidad de toxina equivalente á 10 veces la dosis mortal. Suero de 100 unidades basta 0,001 cc. etcétera. Método de ensayo v. Ehrlich Klin. Jahrbuch. Tomo VI.

8. Bacilo de la influenza

Los cultivos se desarrollan sólo á temperaturas superiores á 30°, sobre agar recubierto de sangre (preferible la sangre de paloma que puede obtenerse estéril con facilidad, sangrando una vena de la cara interna

del ala) ó mejor mezclado con aquélla (en proporción necesaria para que el agar quede casi rojizo). Se emplea también como medio de cultivo, el caldo adicionado de $\frac{1}{2}$ ·1 0/0 de sangre (se hace congelar y se descongela de nuevo, con lo que queda disuelta la hemoglobina.) Conviene ensayar la esterilidad de los medios adicionados de sangre, teniéndolos 24 horas á 37°, antes de sembrarlos.—Inmóvil, bacilos muy pequeños. Se inoculan únicamente los monos.

Para el islamiento del b. influenza, se toma como materia de ensayo un esputo bronquial (desprovisto previamente de la parte mucosa, por una serie de lavados en agua estéril, contenida en varios pocillos) ó en caso de muerte ocasionada por influenza-pneumonía, se añade un poco de la secreción de los focos bronco-pneumónicos en 1-2 cc. de caldo, agitándolo hasta obtener emulsión ligeramente turbia.

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

Para colorar, azul metileno de Loeffler, mejor aún

solución de fuchina fenicada diluída al décimo (v. página 62, teñir varios minutos!) No puede emplearse el método de Gram. Los cortes se tiñen según el método Pfeiffer (v. pág. 64.)

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

9. Bacilo tífico

(incluídos los b. paratíficos)

Se puede cultivar el b. tif. sobre todos los medios ordinarios. Se desarrolla á la temperatura ambiente y también en medios ligeramente ácidos. Se pueden obtener cultivos puros muy fácilmente, sembrando del bazo del cadáver de un tifódico.

Se tiñe con todos los colores de anilina usuales, no toma el Gram. Las preparaciones hechas con cultivos, conviene fijarlas bien sobre el *cubre*, ya que los bacilos se desprenden con facilidad. Al examinar cortes (se ha de diferenciar con mucho cuidado, porque el b. tífico se decolora fácilmente) hechos con bazo humano, se buscan primero con poco aumento las agrupaciones de bacilos, que se presentan de color azul claro, si se ha teñido con azul de metileno alcalino, en rojo vivo si se emplea fuchina fenicada ó anilinada y en violeta brillante si se tiñe con thionina. (Para producir grandes agrupaciones de bacilos, se pone el bazo, envuelto en un paño humedecido en solución de sublimado para cortar la putrefacción superficial, en la estufa á 37°, durante 24 horas; con esto aumenta considerablemente el número de bacilos, luego se endurece.)—No produce esporos.

**Diagnóstico diferencial entre el b. tífico
y otros bacilos parecidos**

(*bacterium coli*, b. paratíficos, b. de la disenteria y otros.)

1. El b. tífico tiene movimiento muy vivo (parecido al de las hormigas grandes de Etiopia) está provisto de numerosos cirros, largos, fácilmente separables, peritrícos, que pueden ponerse de manifiesto por el método de maceración de Loeffler, adicionando 1 cc. de NaOH al 1 % (referencia v. pág. 75.)

2. El b. tífico produce sobre placas de gelatina, colonias de color gris, hasta amarillentas, redondas, ovales ó en forma de piedras de afilar, las *profundas*, y colonias *superficiales* de color gris claro, en forma de velo y profundamente surcadas. Las colonias se vuelven ligeramente pardas al cabo de muchos días. No licuan.

3. El b. tífico se desarrolla sobre la patata en forma de césped apenas perceptible. Siembras de colonias parecidas (b. tífico y bacilos parecidos) sobre fragmentos de la misma patata ó en distintos sitios del mismo fragmento.

4. El b. tífico se desarrolla en la leche sin caseificarla (en la estufa á 37°, varios días.)

5. El b. tífico produce sobre el suero tornasolado (v. pág. 45) á lo más un 3 % de ácido $\frac{N}{10}$. (El suero queda casi incoloro.)

6. El b. tífico carece de poder de fermentación sobre la glucosa. (Ensayos v. pág. 43, preferente picadura en agar glucosado ó bien siembra en caldo glucosado y en tubos de fermentación. Optimo á 37°.)

7. El b. tífico no produce indol. (Examen, v. página 47.)

8. El b. tífico dá la reacción de los cromo-proteidos, (v. pág. 47.)

9. El b. tífico no cambia el color del agar adicionado de *neutralrot*. (Al agar preparado con 0,3-0,5-0,75 % de agar y 0,3-0,5 % de glucosa, se le añade 1 % de solución acuosa saturada en frío de *neutralrot*, esterilizada en corriente de vapor. Siembra por picadura en tubos muy llenos del medio ó bien por fraccionamiento en el medio líquido. En lugar del agar, se emplea también la gelatina al 10 %; en ambos casos se tiene á 37°. El Bact. coli y otros tiñen en verde fluorescente, decoloran luego completamente y en parte producen gases.)

10. El b. tífico deja inalterada una solución débil de tornasol, adicionada de 1 % de nutrosa, á 0,5 % de NaCl y 1 % de lactosa (preparada *con las precauciones* indicadas en el agar nutrosa tornasolado pág. 113) teniéndola 24 horas á 37°. (Diferenciación del bact. coli, que produce gas, tiñe la solución en rojo y produce coagulación); si á la misma solución se le añade en lugar de lactosa, 1 % de glucosa, el b. tífico tiñe en rojo y coagula á las 24 horas á 37°. (Diferenciación del b. de la disenteria, que al cabo de 24 horas sólo colorea en rojo y no produce coagulación hasta más tarde.)

Hay microbios que sólo pueden diferenciarse del b. tífico por algunas de las diez anteriores pruebas. Así, por ejemplo, el *Bar. faecalis alcaligenes*, se diferencia sólo por el ensayo 5 y por el nr. 10, igual en esencia á aquél (produce alcali), el b. de la disenteria sólo por el ensayo 1 (carencia de movimientos), por el 10 y por una reacción indicada al tratar del bac. de la disenteria pág. 120. También los *b. paratíficos* que producen clínicamente iguales afecciones y de los cuales se han distinguido dos tipos, son parecidos en mu-

chas propiedades. (Los *b. paratíficos A*, raros, producen colonias superficiales circulares sin los surcos indicados en el número 2, los *b. paratíficos B*, más frecuentes, los producen parecidas, pero más gruesas, blanquecinas, irisadas cuando jóvenes, tiñen en pardo la patata, aclaran la leche con lenta producción de alcali, hacen alcalino el suero-tornasol á los 8-10 días; ambos producen gases y fluorescencia en el ensayo núm. 9, producen coagulación en la solución de tornasol-nutrosa-glucosa.) Si bien hasta ahora no se conoce microorganismo alguno, que sea igual al *b. tífico* en los 10 ensayos, el medio más seguro para el diagnóstico es:

11. La **sueroreacción** *en forma de bacteriolisis en el cuerpo de los animales* (a) ó *en forma de aglutinación* (b).

(a) **Bacteriolisis en el cuerpo de los animales** (la llamada *reacción de Pfeiffer*).

Fundamento: Inyectando en la cavidad peritoneal de un cobaya, *b. tífico* mezclado con suero de un animal, inmunizado completamente para el mismo, el *b.* se disuelve rápidamente (se deshace ó degenera visiblemente), no sucediendo lo propio si la inyección se hace con suero de un animal normal. Los bacilos parecidos al *tífico*, son atacados por el *b. tífico* ó por el suero normal. (Sólo tiene valor para determinadas relaciones cuantitativas, entre el suero y los cultivos y para determinada virulencia de los bacilos!)

Ejecución: Es necesario:

α) el exacto conocimiento de la *eficacia* del suero inmunizante (su título). Este se determina mediante cultivos virulentos de *b. tífico*, de los cuales $\frac{1}{10}$ de öse = 0,2 mg. (modo de dosificar, véase pág. 168), diluído en 1 cc. de caldo, é inyectado en el peritoneo de un cobaya de unos 250 gr., le produzcan la muerte á las 24 horas, con descenso de temperatura y abundante

producción de bacilos. Se hacen diluciones del suero en caldo, de modo que 1 cc. de la mezcla contenga 0,01, 0,005, 0,001 de suero, ó menos, se toma con una öse, porciones de un cultivo de 20 horas, en agar, del bacilo virulento (ó sea 10 veces la dosis mortal) y se diluyen en 1 cc. de cada una de las anteriores mezclas de suero-caldo y se inyecta luego cada una en la cavidad peritoneal de un cobaya (se hace una incisión en la piel del vientre, se atraviesa la capa muscular con una cánula roma y se inyecta). Al cabo de diferentes espacios de tiempo (30, 60, 120 minutos) se toma una prueba del contenido peritoneal (clavando tubos capilares, obtenidos estirando á la llama tubos de vidrio, en la capa muscular del vientre en el sitio donde se seccionó la piel; en el capilar se introduce algo del contenido peritoneal) y se examina en gota suspendida (se hace salir el contenido, calentándolo con la mano teniendo cerrado el otro extremo con un dedo y recibéndolo sobre un cubreobjetos). Si al cabo de unas 2 horas, lo más tarde, desaparecen los bacilos ó sea que han sufrido la disolución ó se encuentran á lo más, algunos aislados é inmóviles, se sabe entonces que la dosis de suero inyectado al animal, ha sido suficiente para preservarle de la influencia de los bacilos. El animal sobrevive sin haber sufrido grandes descensos de temperatura. La dosis de suero mínima, que llegue á producir dicho efecto, constituye el título del suero. El que se emplea para la reacción Pfeiffer debe tener, á ser posible, un título de 0,001 ó aun menos (por ejemplo, 0,0001). (Obtención de suero inmunizante, véase pág. 169).

β) Suero de un animal normal, perteneciente á la misma especie que el que sirvió para obtener el suero inmunizante. (Tiene experimentalmente efectos preservativos semejantes al suero inmunizante, tomado en

cantidad de algunas décimas de centímetro cúbico.)

γ) Un cultivo en agar de unas 20 horas, á 37°, de un bacilo ensayado previamente.

δ) Dos cobayas de unos 250 gramos de peso, 2 jeringas, pipetas, tubos vacíos estériles y tubos de caldo.

Cobaya. A. Inyección en el peritoneo: Se recoge 1 öse=2 mgr., del cultivo sobre agar, del bacilo que se ensaya y se diluye en 1 cc. de la mezcla de caldo con suero inmunizante, que contiene este último en proporción de 10 veces el título del suero (eventualmente, puede añadirsele en proporción muchas veces mayor, pero nunca más de 0,02 cc.) (Véase con referencia á esto, 3.^a posibilidad!)

Cobaya B. Recibe la misma dosis de cultivo en una mezcla de 0,95 cc. de caldo y 0,05 cc. de suero normal.

Á los 30, 60 y 120 minutos, examen del contenido peritoneal del animal (toma, con un capilar); ulterior observación del animal. Pueden ocurrir:

1.^a Posibilidad. En el cobaya A desaparecen los bacilos rápidamente, el animal sobrevive. En el cobaya B no desaparecen, se multiplican mucho, el animal muere bajo descenso de temperatura. Conclusiones: El cultivo era de verdadero bacilo tífico, puesto que el suero inmunizante ha influído, mientras que el suero normal que se ha empleado en gran cantidad no ha obrado.

2.^a Posibilidad. En los cobayas A y B desaparecen los bacilos, los animales sobreviven. Conclusiones: El cultivo es muy poco virulento para que la prueba resulte. (N. B. no se tolera el empleo de una dosis de cultivo superior á 1 öse!) En caso necesario, puede ensayarse el aumento en la virulencia por medio de pasos en cuerpos de cobayas, por ejemplo: 1. Inyección intraperitoneal de 2 öses, el animal muere. Se

hacen siembras sobre agar, con el contenido de la cavidad abdominal. 2 Inyección intraperitoneal de 1 öse de este cultivo, el animal muere, cultivo sobre agar como antes y 3 inyectando $\frac{1}{4}$ öse de este último, el animal muere. Ahora se ensaya la reacción con 1 öse de cultivo + suero como antes se ha dicho.—Por lo demás, la posibilidad 2 sólo tiene lugar con los verdaderos b. tíficos, cuando estos proceden de cultivos antiguos. Los b. tíficos aislados recientemente de un cuerpo animal, son casi siempre muy virulentos.

3.^a Posibilidad. Los bacilos no desaparecen ni en el cobaya A ni en el B. Ambos animales mueren. Conclusiones: Los cultivos no son de b. tífico. Cultivos de b. tífico de tal virulencia, que la cantidad de suero inmunizante empleada en el ensayo, igual á 10 veces su título, sea insuficiente para neutralizar la infección producida por 1 öse de cultivo, no se conocen. Si tales hubiera, no sería exacta la conclusión, como se comprende fácilmente. Sin embargo, la misma reflexión conduce, á que en el caso de emplearse suero inmunizante de menor potencial que el antes citado, no deben sacarse conclusiones sin más ni más. Suponiendo que se dispone de suero de un título 0,01 cc. y se emplean 0,02 cc. (no es conveniente tomar más porque si no podía entrar en funciones junto con él, la influencia del suero normal!) la dosis de suero preserva de una dosis de cultivo 20 veces mortal (título de unas 10 veces, la cantidad doble del título será por tanto unas 20 veces). Si el cultivo ensayado tiene una dosis mínima mortal de $\frac{1}{50}$ de öse y se inyecta con la dosis de suero 1 öse de cultivo, se ve claramente que la cantidad de suero, no basta para preservar de la cantidad de cultivo (50 veces múltiplo de la dosis mínima mortal.) La disolución de los bacilos no es completa y el cultivo puede ser sin embargo de b. tífico. Por tanto: ó se emplea solamente

suero de gran potencia ó si sólo se dispone de suero de poca potencia: Se ensaya la virulencia del cultivo examinado, inyectando intraperitonealmente á una serie de cobayas, dosis de cultivo desde $1/10$ - $1/100$ de öse. Luego se inyecta un múltiplo de cultivo tal, que la cantidad permitida de suero (0,02 cc.), si el cultivo es de b. tífico, deba servir seguramente para neutralizarlo, se mezcla con esta cantidad y se procede como antes se dijo. Si se realiza la posibilidad 3, conclusión admisible como antes.

b) **Aglutinación** (Gruber-Durham- R. Pfeiffer).

Fundamento: El suero inmunizante antitífico, inmoviliza el b. tífico, aún en las mayores diluciones y los reúne en forma de grumos, los aglutina; el suero normal sólo produce estos efectos, muy concentrado. El suero inmunizante actúa sobre los bacilos semejantes al tífico, á lo más, un poco más enérgicamente que el normal.

N. B. Los *b. tíficos recientemente extraídos de un cuerpo animal, son aglutinados alguna vez, después de sembrados en medios de cultivo artificiales, por el suero tífico.*

Ejecución. Se necesitan:

a) Suero inmunizante de fuerza conocida. Para obtenerlo se procede como se dijo en la pág. 104 *a) a)*. Se hacen diluciones de b. tíficos virulentos, en NaCl al 0,8 ‰, adicionado de diferentes cantidades de suero inmunizante y colocado en pequeños tubos de ensayo (de 0,5-0,6 cm. diámetro por 6-8 cm. de longitud, estirados en punta cónica por su parte inferior) y se observa, *primero*, á que cantidad de suero adicionado se efectúa la inmovilización y aglutamiento del b. tífico, haciendo la observación en gotas suspendidas, que se mantienen á 37° á lo más 2 horas; la cantidad mínima necesaria, para que dichos fenómenos se efectúen, constituye el

título del suero para el ensayo de las gotas; *segundo*, que adición de suero es necesario, para que en el contenido de los tubos se formen, al cabo de 2 horas lo más tarde, copos perceptibles á simple vista ó con una lente, perfectamente visibles por refracción sobre un fondo luminoso; la cantidad mínima necesaria para ello, constituye el título para el ensayo en tubos (se fijan de modo análogo al título para gotas suspendidas).—El suero debe ser activo por lo menos á una dilución de 1 : 1000 de solución al 0,8 % de NCl, en el ensayo de los tubos. El suero de mayor potencia, ha sido considerado por muchos autores, como no recomendable, porque tiene también acción sobre los bacilos análogos al tífico, hasta un límite determinado. Se evitan errores, no obstante, si se considera en que menor proporción debe aglutinar el suero á los bacilos pseudotíficos, antes que al tífico verdadero.

β) Suero normal de un animal perteneciente á la misma especie, que él que sirvió para obtener el suero inmunizante. Examen del título del suero normal correspondiente como en α. El suero normal debe ser mucho menos activo que el inmunizante (p. ej. título de 1:20 del normal, 1:1000 de suero inmunizante.)

γ) Un cultivo sobre agar, de unas 20 horas á 37°, de la especie bacteriana que se examina.

Se preparan diferentes diluciones del suero inmunizante en solución al 0,8 % de NaCl, p. ej. 1 : 200, 1 : 300, 1 : 500 y 1 : 1000. En la mezcla que contenga mayor proporción de suero inmunizante, ha de estar éste por lo menos diez veces más diluído que el título del suero normal (p. ej. si el título del suero normal es 1 : 20, la mayor concentración del suero inmunizante será 1:200). De cada dilución se pone 1 cc. en un tubo de ensayos afilado (v. párrafo α), se marcan exactamente los tubos y se añade á cada uno, una öse pequeña (2 mg.) del

cultivo que se examina, desmenuzándolo con mucho cuidado en el punto de contacto del líquido con la pared del tubo, teniendo éste en posición inclinada. Se preparan gotas suspendidas con el contenido de los tubos y se colocan junto con éstos en la estufa, á 37°.—Además de esto se ensaya para comprobar, una cantidad igual del mismo cultivo, puesto asimismo en 1 cc. de una mezcla de caldo con suero normal, en proporción igual á la mitad de su título (así p. ej. si el título es 1:20, la relación será de 1 : 40). Se observa durante 2 horas y cada 10-20 minutos.

Puede ocurrir:

Posibilidad 1. En el suero inmunizante se apelotonan los bacilos en todas las pruebas ó sólo en las que contienen más suero, en el suero normal no se apelotonan. Luego se trata de un cultivo de b. tífico. (Esta conclusión no es aceptable, sin embargo, cuando la diferencia entre el título para el b. tífico y la dilución del suero necesario para aglutinar los bacilos que se ensayan, es muy grande, p. ej. el título es 1 : 5000, la aglutinación del bacilo examinado se efectúa al 1:50, y no á más de 1 : 100. Luego puede hacerse además el ensayo de Pfeiffer, v. pág. 104 a).

Posibilidad 2. En ambos sueros se apelotonan los bacilos (caso muy raro.) Puede ser el cultivo de bacilo tífico muy poco virulento. (Verosímil, si hasta las menores dosis de suero inmunizante, ó sean más pequeñas que su título, producen apelotamiento.) Ensayo de la virulencia y en caso necesario repetir la reacción después de aumentar la virulencia, (v. pág. 106 final.)

Posibilidad 3. En ninguno de los dos sueros se apelotonan los bacilos. Luego no se trata de un cultivo de bacilo tífico.

Obtención del suero inmunizante, v. pág. 169. El suero de convalecientes del tifus, no sirve para el diag-

nóstico diferencial, porque en la mayor parte de los casos tiene una acción débil para este fin, y además muchas veces aglutina á los bacilos análogos al tífico, (véase pág. 118 c).

Diagnóstico bacteriológico del tifus en el hombre

El método más seguro, es la investigación del bacilo tífico en los tejidos y en las evacuaciones, menos positivos es el ensayo del poder aglutinante del suero. Se efectúa preferentemente, si se presenta la posibilidad, con los métodos números 1 y 2 que á continuación se describen y se comprueba por los números 3 y 4, y en caso necesario también por el 5. Los gérmenes obtenidos del cuerpo y que se presentan como b. tífico, se ensayan siempre por medio de todos los criterios, (v. pág. 102 y siguientes de 1-10 y el 11 b. ó también a), puesto que se presentan enfermedades análogas al tifus, que no las produce el b. tífico sino otros microbios parecidos á él.

1. *Análisis de las roseolas.* Se limpia convenientemente la piel en el sitio adecuado, por medio de algodón, alcohol y éter. Se hace una ligera incisión con el escalpelo y con la punta de este *rápidamente*, antes de que salga sangre, se recoge un poco de humor del tejido y se siembra en caldo. Se ponen sobre la herida un par de gotas de caldo, para aminorar el poder bactericida de la sangre y la sangre diluída de este modo se siembra también en caldo. Identificación de los bacilos una vez desarrollados, según la pág. 102 y siguientes: Se examinan siempre varias roseolas y sólo las recientes. El método da resultados positivos en las $\frac{3}{4}$ partes de los casos.

2. *Investigación del b. tífico en la sangre.* Se hace una toma de 10-20 c. c. de sangre, de la vena mediana, por medio de una jeringuilla, (v. pág. 153, párrafo 2). Se siembran, cada 10 gotas de sangre, en 20 c. c. de caldo ó se mezcla con agar calentado á 40° (3 partes por 1 de sangre) y se pone en placas. (Las colonias del b. tífico y de los paratíficos aparecen verde-negruczas). En el 90 % de los casos da resultados, ya en la primera semana de la enfermedad. Es preferible la siembra en agar, porque puede averiguarse el número de gérmenes y en caso de contaminaciones, se dispone de colonias aisladas para obtener cultivos puros. Desarrollo en una mezcla de 2,5 de sangre, con 5 c. c. de bilis de buey hervida (germinación en 12-24 horas á 37°). La mezcla, en la que queda la sangre incoagulable, se recomienda también en el caso de remitir el material que se examina. También puede emplearse para reconocer el b. tífico, el coágulo formado en la sangre tomada para efectuar la reacción Widal (página 116 nr. 4); las siembras en placas se han de hacer con no pequeñas cantidades (v. nr. 3). Además, puede hacerse germinar previamente, en tubos de bilis (véase antes.)

3. *Investigación del b. tífico en las heces fecales.*

a) Por medio de cultivos ordinarios en placas, usando la gelatina neutra ó neutralizada del todo, da resultados muchas veces, particularmente cuando el reconocimiento se hace en los excrementos de la 2.^a semana de la enfermedad. Se hacen siembras de las abundantes colonias de las placas, parecidas al tifus, se ensaya el poder fermentativo de los cultivos (v. página 102 Nr. 6) y ulterior examen de aquellos cultivos que no hacen fermentar el azúcar, según los métodos descritos en la pág. 102 y siguientes.

b) Dá resultados mucho mejores el método de

Drigalski y Conradi (Ztschr. f. Hyg. Bd. 39). *Nutrosa-agar-tornasol*: 1,5 kg. de carne de caballo se pone á macerar en 2 litros de agua, en frío y durante 24 horas. El agua de carne obtenida por compresión, se hierve 1 hora, se filtra y se le añade 20 de peptona seca Witte, 20 de nutrosa, 10 de NaCl. Se hierve 1 hora, se filtra y luego se le añade 60-70 de agar fino en barras, cortado en pequeños pedazos, se cuece 3 horas en corriente de vapor ó 1 hora en autoclave, se alcaliniza ligeramente respecto al papel tornasol, se filtra y se hierve $\frac{1}{2}$ hora. A este agar, después de enfriarse un poco, se le añade solución de lactosa-tornasol calentada á 40-50° (solución de tornasol de O. Kahlbaum, Berlín S.O, 260 c. c. se hierve 10 minutos y se le añade 30 de lactosa químicamente pura y se hierve 15 minutos máximo); se agita bien y se hace la reacción, que ha variado algo, ligeramente alcalina otra vez. A la mezcla se le añaden 4 c. c. de una solución caliente y estéril de carbonato sódico anhidro, al 10 ‰, en agua, luego 20 c. c. de una solución reciente de 0,1 gr. de cristal violeta B, Höchst, en 100 c. c. de agua destilada caliente y estéril. Una parte de la mezcla se distribuye en placas grandes, de unos 15 cm. de diámetro (en capas de 2 mm. de grosor por lo menos) y para tener de repuesto, se vierte la otra parte en matraces de 200 c. c., que se llenan (no se emplean grande matraces para guardarlo, por que necesitaría una calefacción demasiado larga para licuarlos). Siembras fraccionadas en la superficie. Se reparte, mediante una varilla de vidrio doblada en ángulo recto. Los excrementos flúidos se extienden directamente y después de diluirlos en 10-20 veces de solución estéril de NaCl al 0,85 ‰, sobre varias placas una después de otra, los excrementos sólidos, se fluidifican con la solución citada y se siembran. Las placas sembradas se dejan abiertas por lo menos $\frac{1}{2}$ hora,

luego se les coloca la tapa y se ponen invertidas en la estufa á 37°. Se examinan á las 14-24 horas. Las colonias de tifus son de 1-3 mm. de tamaño, azules, transparentes, sin doble contorno, semejantes á gotas de rocío, en cambio las colonias de *b. paratíficos*, de *bact. colí*, tienen de 2-6 mm. son rojas brillantes, no transparentes. Ulterior examen de las colonias sembradas, según los métodos de diferenciación del 1-11. (Pág. 102 y siguientes) la identificación más rápida, por aglutinación sobre el cobre-objetos (11. b. Pág. 108.)

c) Son también apropiados los medios de cultivo con fuchina según *Endo* (Ctrbl. f. Bakt. Abt. I. Or. 35 pág. 109). Un litro de agar al 3 % (v. pág. 17) neutralizado y alcalinizado con 10 c. c. de solución de carbonato sódico al 10 %, se mezcla con 10 gr. de lactosa químicamente pura y 5 c. c. de solución alcohólica saturada de fuchina, filtrada, y luego con 25 c. c. de solución reciente de sulfito sódico al 10 %. El medio de cultivo de color rosado en caliente é incoloro casi, cuando frío, se guarda en un sitio obscuro. Siembras en placas como en *b.*) El *b. tífico* y los *paratíficos* lo dejan incoloro y el *Bact. coli* tiñe en rojo intenso. (No conviene sembrar antes de las 20-24 horas.)

d) Combinación del método *b)* con los medios á base de cafeína, según Roth Ficker y Hoffmann, (Arch. Hyg 49, Págs. 199, 229): Cien c. c. de agua de carne de buey, con 6 % de peptona Witte y 0,5 % de NaCl se mezclan con 38,64 %, de la cantidad de sosa normal, necesaria para dar color rojo con la fenoftaleína en la solución neutra. (Examen y cálculo análogos al de la pág. 19, Nr. 3), luego se esteriliza en corriente de vapor. A esta mezcla se le añaden, asepticamente, 195 c. c. de solución de cafeína al 1,2 % y 1,4 c. c. de solución de cristal violeta al 0,1 % (ambas soluciones preparadas en frío y con agua destilada y vasijas estériles.)

En la mezcla se siembran inmediatamente los excrementos líquidos (0,8-0,9 c. c.) Los más consistentes ó los excrementos sólidos, se desmenuzan en una cápsula estéril con 1-2 partes de solución de cafeína al 1,2 % y se filtran por algodón estéril; siembras de 0,8-0,9 c. c. del líquido filtrado. A las 13 horas de estar en la estufa á 37° se hacen siembras sobre nutrosa-agar-tornasol, (v. pág. 112 b).

e) *Gelatina verde de Loeffler*: (D. m. W. 1906 nr. 8) Gelatina preparada con caldo (2 kg. de carne de buey en 5 litros de agua corriente) 15 % de gelatina, 1 % de peptona Witte, 0,5 % de NaCl, neutra para el tornasol, se adiciona por cada 100 c. c. con 2 c. c. de solución de ácido fosfórico al 1,4 % y con 3,5 c. c. de solución acuosa al 0,2 % de verde malaquita nr. 120, solución concentrada. Se añade 1 gota del material analizado á 2 tubos con 20 c. c. de esta gelatina cada uno, uno de ellos se vierte en una placa y el otro se coloca directamente en la estufa á 37° y sirve de cultivo previo. Al cabo de 12, 18 y 24 horas, se toman gotas de este cultivo y se pasan otros tubos con 20 cc. de gelatina verde, una gota en cada uno y después de permanecer en la estufa los mismos espacios de tiempo que los anteriores, se siembran de nuevo 3, 2 ó una gotas, en nuevos tubos con 20 cc. de gelatina verde. El contenido de los tubos sembrados, se vierte en placas que se ponen en la estufa, á 25°. Las colonias de tifus aparecen á las 24 horas, del tamaño de una cabeza de alfiler, transparentes muy brillantes, de color gris claro, granujientas muchas veces presentan apéndices; á las 36-48 horas aumentan considerablemente, se hacen grises amarillentas, con numerosos apéndices (*festoneadas*). Estos apéndices ó prolongaciones alrededor de las colonias son muy característicos. El *Bacterium coli* no prospera sobre este medio de cultivo. *Agar verde* de Loeffler

(id. id.): Agar neutro al 3 % + 5 c. c. de NaOH normal por litro + (al final de la esterilización) 100 c. c. de sol. de nutrosa al 10 %, por litro y se le añaden luego 1,3 c. c. de sol. acuosa al 0,2 % de sal doble, verde malaquita—cloruro de zinc (Höchst). Se vierte en placas, se siembra extendiendo las deposiciones encima. Si es necesario se hace cultivo previo de la deposición, de 6—12 horas, á 37°, en caldo (neutralizado para el tornasol, con Na₂ CO₃) + 5 c. c. de NaOH normal, 10 c. c. de sol. de nutrosa al 1 % y 30 c. c. de sol. de verde malaquita al 2 % (120 Höchst), por litro.

Las colonias del b. tífico son transparentes con los bordes dentados, retardan el desarrollo del b. coli, las colonias de los b. paratíficos son grandes, grises y viscosas, el medio de cultivo se decolora en el borde.

4. **La suerorreacción de Widal.** Fundamento: El suero sanguíneo de los enfermos de tifus, posee la propiedad, después de 8 días de iniciada la afección, de presentar poder esglutinante respecto al b. tífico (v. antes 11 b. pág. 108). El suero de los no enfermos del tifus, sólo aglutina estando muy concentrado (véase sin embargo la página 118 a.) Sangrías v. págs. 154 y 170. (N. B. Los bacilos tíficos aislados pueden ser aglutinables en diferente grado, por esto es conveniente hacer primero un ensayo con suero inmunizante!)

Modo de efectuar la prueba de la aglutinación (véanse además las instrucciones para combatir el tifus.—Untersuch.—Amter por K. G. A. 1903 N.º 36. Suplementos especiales). — Prescripciones generales véase también pág. 154):

El suero medido en una pipeta de 1 c. c., dividida en $\frac{1}{100}$, se diluye en 50 veces su volumen de solución estéril de NaCl al 0,8 %. Si de esta dilución resultan menos de 2 c. c., se verifica la prueba de la aglutinación sobre cubre-objetos, en caso contrario se hace en tubos

de ensayo, con 0,5-1 c. c. cada uno. (v. pág. 108 b. α , la forma y tamaño de los tubos.)

Prueba microscópica de la aglutinación: Se colocan sobre una serie cubre-objetos, gotas de la dilución 1:50 y sobre otra serie se ponen gotas de una dilución al 1:100, preparada con aquélla. Mediante la punta de una aguja, se añade á las gotas de las dos diluciones y hasta que aparezca á simple vista un enturbiamiento, un poco de material bacteriano procedente de un cultivo del b. tífico, sobre agar, que tenga menos de 48 horas, á una de ellas, y de cultivo de bacilos paratíficos (tipos A y B), á otras dos series; la aguja de platino se calcina luego y las gotas se extienden regularmente y se observan luego en gota suspendida.

Prueba macroscópica de la aglutinación: Una parte del suero diluído al 1:50, se diluye al 1:100 añadiéndole una cantidad igual de solución de NaCl al 0,8 ‰. En ambas diluciones, puestas en tubos, se ensaya el poder aglutinante respecto al b. tífico y al mismo tiempo sobre los paratíficos, (tipo A. y B.) En cada c. c. de suero diluído se pone una óse normal (2 mg.-v. pág. 168) del cultivo correspondiente, desmenuzándolo cuidadosamente sobre la pared del tubo. Los tubos, se dejan 3 horas á 37° ó se dejan desde la tarde, hasta la mañana siguiente, á la temperatura ordinaria.

Ensayo de la reacción: La aglutinación, incluso la que se verifica en las pruebas de los tubos, debe comprobarse siempre mediante el microscopio, en especial cuando el suero contiene mezclados glóbulos sanguíneos. La prueba aislada, hecha sobre el cubre-objetos con el suero diluído al 1:50, tiene únicamente valor para la orientación. Si en todos los campos de visión hay abundantes montoncillos, incluso algunos constituídos sólo por 6-7 bacilos y se encuentra en la preparación sólo algún bacilo originario, aislado, á veces junto á

otros bacilos ya fraccionados ó destrozados, la reacción se considera positiva. Si sólo resulta positiva la prueba en los tubos al 1:50 y no en los de 1:100, el caso es sospechoso; entonces es necesario repetir la investigación al cabo de algunos días, con suero procedente de una nueva sangría. Si la prueba resulta positiva sólo con los bacilos paratíficos, se trata probablemente de un caso de *paratifus*, debiendo sin embargo probarse la presencia del b. paratífico en el cuerpo enfermo.—Es *recomendable* preparar además desde el principio, mayores diluciones y fijar exactamente el *límite de acción* del suero, sobre el b. tífico y los paratíficos.

La suerorreacción de Widal tiene numerosas causas de error, especialmente las siguientes:

a) El suero sanguíneo de hombres que han estado enfermos de tifus, algunos meses y aún algunos años antes y que sufren una afección diferente á aquélla, puede aglutinar el b. tífico. El suero de los ictericos presenta á menudo un poder aglutinante muy exaltado,

b) El poder de aglutinación del suero, no se desarrolla en los tíficos en un determinado periodo de la enfermedad, muchas veces casi no se nota.

Cuando dá resultados negativos la aglutinación y sin embargo, existe clínicamente la sospecha de que se trata de infección tífica, se recomienda la repetición de la prueba al cabo de algunos días.

c) En caso de infección tífica, el suero puede aumentar en poder aglutinante sobre los b. paratíficos y viceversa en las infecciones paratíficas, la aumenta respecto al b. tífico. En casos dudosos, se aconseja hacer grandes diluciones del suero p. ej. de 1:100, 1:200, 1:500 etcétera, y ensayar el poder aglutinante respecto al b. tífico y los paratíficos; el bacilo causante de la infección, es aglutinado por regla general, cuatro veces más, que

los demás bacilos sobre los cuales efectúa el suero la llamada «reacción de grupos» (homogeneidad de familias de las especies de bacilos análogos) aglutinándolos si actúa en cierta cantidad. (Elección del cultivo tífico apropiado para estos ensayos v. pág. 117.

A pesar de todo la reacción de Widal tiene, juzgándola rectamente, mucha importancia como coadyuvante para el diagnóstico clínico. Desde los puntos de vista terapéutico y sanitario, las infecciones tíficas y paratíficas se tratan del mismo modo.

No hay que limitarse, según lo dicho, á ver si «la reacción de Widal resulta positiva» sino determinar la clase de ensayo (ensayos en tubos ó en laminillas), el grado hasta el cual el suero diluído es activo, el tiempo que se necesita para que se efectúe la aglutinación y la intensidad de la reacción (aglutinación completa, etc.)

Preparados de bacilos tíficos y paratíficos, exentos de gérmenes vivos, para efectuar la reacción de Widal, pueden obtenerse de la casa E. Merck-Darmstadt. (Tifus—diagnóstico de Ficker, B. K. W. 1903 N.º 45); puede usarse en el ensayo de los tubos y es cómodo para la práctica. O bien: Se añade al caldo de cultivo de b. tífico de un día, 1 % de formol al 40 % y se pone 2 días en la estufa á 37°, se separa del sedimento formado y se guarda en la nevera. Inalterable, pero que se aglutina poco á poco con facilidad.

5. En la orina se encuentra el b. tífico en $\frac{1}{4}$ parte de los casos, no obstante, por regla general, no aparece hasta las 3 semanas de iniciada la afección. El análisis se efectúa preferentemente según las págs. 113-114 b, c, e.

Después de pasado el tifus, las deyecciones y la orina pueden contener b. tíficos durante meses y aún años. Por tanto, en casos de afecciones dudosas, se hará la investigación teniendo en cuenta la historia clínica del enfermo.

Aislamiento del b. tífico del agua

Procedimiento más sencillo: Se hacen las correspondientes siembras de agua, como en el análisis de aguas en general (pág. 158) aunque sobre los substratos indicados en la pág. 112 y siguientes: (En caso necesario se centrifuga el agua y se siembra en superficie, el sedimento). También pueden ensayarse los cultivos previos (pág. 111 y sigs.) Se preparan gran número de placas, se siembran las colonias sospechosas, se ensaya su poder de fermentación y en caso de resultados negativos, se procede según la pág. 101 y sigs.

Hay numerosos procedimientos particulares de análisis, véase por ejemplo trabajos de Müller, en Zschr. f. Hyg. 51, pág. 1; sin embargo ninguno de ellos está bastante acreditado todavía.

10. Bacilo de la disentería

A. Tipo de Kruse-Shiga

Es extraordinariamente parecido al b. tífico, en forma y desarrollo. Se hacen siembras de las evacuaciones (grumos, partes mucosas) sobre nutrosa-agar-tornasol (v. pag. 112, b. preparado con ó sin adición de cristal violeta. Desarrollo como en el b. tífico). El suero de los disentéricos presenta, aunque tarde, poder aglutinante respecto al b. disentérico; en diluciones de

suero al 1 : 50, la aglutinación es comprobada, para la disentería.

Caracteres más importantes:

1. Inmovilidad (aun cuando posee movimiento molecular muy vivo), carencia de cirros. (Diferenciación del b. tífico).

2. No hace fermentar la glucosa (Ensayos véase pág. 102. 6).

3. No produce indol (Ensayos v. pág. 47).

4. Produce ácidos en el caldo-tornasol, como el b. tífico (v. pág. 102 nr. 5).

5. Desarrollo en el nutrosa-agar-tornasol, como el b. tífico (v. pág. 112, b); medio de cultivo preparado con ó sin adición de cristal violeta.

6. Desarrollo sobre el nutrosa-agar-tornasol, con manita (preparado según la pág. 112 b, pero en lugar de lactosa, se emplea igual cantidad de manita). El b. de la disentería deja, en los cultivos en picadura, las capas superiores inalteradas y decolora las capas profundas; el b. tífico, el bact. coli y la mayor parte de los demás microbios parecidos al de la disentería, tiñen el medio de cultivo en rojo, algunos en azul; en parte producen gases. Una solución (preparada debidamente) de 10 de nutrosa, 5 de NaCl, 50 de sol. de tornasol y 20 de manita en 1000 de agua, queda inalterada por el desarrollo del b. de la disentería, otros bacilos lo tiñen en rojo ó en azul, producen gases (en tubos de fermentación pág. 43) ó coagulación.

7. Aglutinación por el suero de animales inmunizados con b. disentérico (Práctica de la inmunización v. pág. 169, ensayos iguales que en el b. tífico pág. 108. La inmunización de animales es difícil, los más apropiados son los carneros y cabras).

8. Ulterior diferenciación del b. tífico, conforme á la pág. núm. 102.

B. *Tipo de Flexner*

Se conduce como el tipo A, sin embargo enrojece el agar-tornasol con manita (v. antes núm. 6) en 24-48 horas, enrojece la sol. de nutrosa-tornasol con manita (v. antes el núm 6) en 24 horas y la coagula en 48 horas, produce indol en el agua de peptona al cabo de algunos días. Además, la aglutinación la efectúa sólo el suero específico, no la efectúa el suero activo para el tipo A (v. antes núm. 7), si existe además una cierta afinidad en forma de semiaglutinación (véase «reacción en grupos» pág. 119,—como en aquel caso conviene determinar el límite de influencia del suero.)

Se prueba la aglutinación con el suero de enfermo, diluída al 1 : 100 ó más. La inmunización de animales, incluso conejos, se hace con facilidad.

Junto á estos tipos se presentan bacilos atípicos que se diferencian en las propiedades particulares, (véase p. ej. Kruse, D. m. M. 07 nr. 8,9.

11. **Bacillus (o Bacterium) coli**

Los típicos representantes de este grupo bacteriano, son algo movibles, presentan 4-12 cirros laterales, forman sobre la gelatina colonias superficiales, vigorosas, á modo de películas bordeadas y las profundas, redondas y parduzcas, no la licúan, sobre la patata producen extensas colonias gris-amarillentas, hacen fermentar fuertemente la glucosa, producen indol, no forman cromoproteidos, coagulan la leche, en el suero-

tornasol hay fuerte y duradera formación de ácidos. Se presentan variedades que carecen de una ó varias de estas propiedades; sin embargo, ninguna variedad licúa la gelatina. Diferenciación del b. tífico v. pág. 102 y sigs. del b. disentérico pág. 120. No toma el Gram. Es patógeno para los cobayas en inyección intraperitoneal (*Peritonitis, septicemia*), alguna vez también es patógeno para estos animales y para las ratas en inyección subcutánea (*septicemia, supuración*). Aglutinación por el suero inmunizante específico, análogo al de la pág. 108, aunque el suero inmunizante no actúe sobre todos los bacilos, sino sólo sobre los que sirvieron para la inmunización y eventualmente algunos otros.

12. Vibriones del cólera

Se pueden obtener cultivos sobre los medios nutritivos generales. Es ventajoso que presenten reacción algo alcalina. El desarrollo sobre la gelatina es particularmente característico. («Fragmentos de vidrio»—colonias en las placas, claras «parecidas á burbujas de aire», en los cultivos por picadura licúan la gelatina en la superficie; no obstante, se presentan colonias atípicas oscuras, amarillentas, con el borde á modo de pelusillas; aisladas, ó entre dos colonias típicas.) Sobre el agar forman colonias azuladas transparentes. Crecimiento abundante en el agua de peptona (v. pág. 22), sobre la patata, sólo se desarrolla si aquella ha sido hervida con sol. de carbonato sódico (al 1 %) ó en agua salada (v. pág. 27, al principio). Un solo cirro polar. Movimiento muy rápido parecido al de los «larvas de mosquito». No tiene esporas. Los cultivos dan la reac-

ción del nitroso-indol (v. pág. 47) no producen fosforescencia (v. pág. 48).

Se tiñe preferentemente con las soluciones de fuchina; empleando el método de Gram se decolora.

El *diagnóstico diferencial* entre el vibrión del cólera y otros vibriones parecidos, es posible frecuentemente por medio de los cultivos en placas de gelatina, y teniendo en cuenta la reacción del nitroso-indol y la fosforescencia, sin embargo para más seguridad, en muchos casos, es necesario además el empleo de la suero-reacción en forma de bacteriolisis (ensayo de Pfeiffer) en el peritoneo de un cobaya, ó la aglutinación; respecto á esto véase pág. 128 y sigs.

Diagnóstico bacteriológico de la afección colérica en el hombre. (Véase Instrucción del consejo federal para combatir el cólera, Berlín. Rich. Schoetz 1905, 0,60 m. 7.^a además Gaffky, Klin. Jahrb. T, 16, pág. 323.)

Para la investigación, sirve una prueba tomada de una evacuación ó bien el contenido de un pliegue intestinal, de la parte media ó inferior del ileon. Se extiende el material sobre una doble placa grande de vidrio. Se escogen las «partes mucosas» para la investigación. Las evacuaciones sólidas se deslíen en agua estéril, para descubrir las partes mucosas.

I. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN

1. *Examen microscópico.*

a) de preparaciones obtenidas por frote (á ser posible de mucosidades). Coloración con sol. de fuchsina fenicada, diluída (1 : 9 de agua).

b) En gota, suspendida preparada con solución de peptona (v. pág. 22), observándola en seguida y al cabo

de $\frac{1}{2}$ hora de estar en la estufa á 37° , al natural y teñida.

2. *Placas de gelatina.* Cantidad de material para la siembra, 1 öse (á ser posible, de una mucosidad), se hacen diluciones, cada una con 3 öse, se preparan 2 series, de 3 placas cada una. A las 18 horas de permanencia á 22° , se examinan con poco aumento, se hacen preparaciones por aplastamiento y eventualmente por frote y además cultivos puros.

La gelatina debe estar constituida por agua de carne, con 1 % de peptona, $\frac{1}{2}$ % de NaCl, 10 % de gelatina y después de neutralizada al tornasol (v. pág. 14 N.º 3) debe añadirsele un 3 %, de una solución de carbonato sódico cristalizado al 10 % (álcali-albuminato-gelatina v. pág. 131.)

3. *Placas de agar:* Se extiende una öse de material, sobre la superficie de 3 placas de agar, una después de otra; ó bien se reparte una öse de material en 5 c. c. de agua de peptona, y se extiende 1 öse de esta última sobre una placa. A las 12-18 horas de estar en la estufa á 37° se examina como en el nr. 2.

El agar ha de estar constituido por agua de carne + 1 % de peptona, $\frac{1}{2}$ % de NaCl, 3 % de agar y ha de alcalinizarse como la gelatina. Las placas han de permanecer $\frac{1}{2}$ hora, á 37° , antes de sembrarlas y han de colocarse con la superficie vuelta hacia abajo y abiertas.

4. *Multiplicación en el agua de peptona:* (véase página 22.)

a) En 6 tubitos de unos 10 c. c. de cabida, se siembra una öse de material en cada uno. A las 6 y á las 12 horas de permanecer á 37° , se examinan al microscopio pruebas de la superficie.—No deben agitarse los tubos. Con el tubo sobre el que existen mayores sospechas de contener el vibrión colérico, se siembran 3 tubos de

agua de peptona, 1 öse en cada uno y con cada uno de ellos se prepara una serie de placas de gelatina y de agar. Los tubos de agua de peptona, se calientan en la estufa á 37° antes de sembrarlos.

b) En un matraz con 50 c. c. de agua de peptona, se siembra próximamente 1 c. c. de una evacuación, se pone en la estufa y se examina como en a.)

5. *Preparación de cultivos puros:* Preferentemente de placas de agar: cultivos en gelatina, por picadura y sobre agar por estría.

6 *Ensayos de los cultivos puros.*

a) Comprobando su aptitud para la aglutinación, véase pág. 123, al final.

b) Por la reacción de Pfeiffer, v. pág. 130.

II. MARCHA DE LA INVESTIGACIÓN

1. En los primeros casos (ó sea cuando todavía no se ha confirmado ningún caso de cólera en la localidad) conviene emplear todos los métodos y en la forma siguiente: a) siembra de 6 tubos de agua de peptona, b) disponer preparaciones microscópicas, c) preparación de 2 series de placas de agar y gelatina, d) examen de las preparaciones microscópicas, e) preparación de cultivos puros, f) ensayo de estos últimos según el número I. 6 a y b.

2. En los casos siguientes (ó sea cuando ya se ha confirmado la presencia del cólera en la localidad) se procede como en II. 1, aunque sólo se preparan 3 tubos de agua de peptona y una sola serie de placas de gelatina y agar, también pueden sembrarse en lugar de placas de agar, tubos con el agar solidificado en posición inclinada. En f) basta el ensayo I 6 a, en gota suspendida.

3. *En casos de infecciones sospechosas* (Diarreicos») y en los *convalecientes*: En caso de que las evacuaciones no tengan aspecto de coléricas, se suprime el examen microscópico. En lugar de los tubos de agua de peptona, se siembra 1 matraz (v. I 4 b). Con este se prepara, después de tenerlo 6-12 horas en la estufa, una serie de placas de agar y de gelatina. Se examinan las colonias sospechosas según el número I. 6 a.

4. *Análisis del agua*: Un litro del agua por lo menos, se mezcla con 10 % de solución concentrada de peptona (v. pág. 22) y se agita perfectamente, luego se reparte en matraces de 100 c. c. y se ponen éstos en la estufa á 37°, se examinan á las 8 y 18 horas, disponiendo gotas de la superficie, en gota suspendida y en preparaciones teñidas, y del matraz en cuya superficie, se hayan encontrado en el microscopio mayor número de vibriones, se hacen siembras en tubos de agua de peptona, se preparan placas de agar y de gelatina y luego se examinan como en II 1. El ensayo de los cultivos puros se hace como I. 6 a y b.

III. JUICIO Y CRÍTICA DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS

En II. 1. El diagnóstico de cólera puede considerarse como seguro, cuando todos los métodos han dado resultados positivos; tienen particular importancia, los I, 6 a y b. Si en el examen microscópico, se presentan vibriones dispuestos de un modo característico (ordenados en serie lineal á modo de peces, en la preparación teñida) casi en cultivo puro y las placas de gelatina presentan colonias de aspecto típico, puede emitirse ya un diagnóstico provisional de cólera, sin embargo antes de dar el diagnóstico definitivo, debe aguardarse á tener los resultados de la investigación completa. Si

las colonias sospechosas, dán en gota suspendida una aglutinación poco perfecta, debe efectuarse la determinación cuantitativa de la aglutinación, tan pronto se hayan obtenido cultivos puros (v. más abajo.)

En II. 2. Puede diagnosticarse el cólera, cuando el examen microscópico dá resultados positivos, el desarrollo en las placas de agar y gelatina es característico y la aglutinación dá resultados positivos en la gota suspendida.

En II. 3. En casos de contagio sospechoso, puede descontarse el cólera, si en 2 exámenes de excrementos, efectuados con 1 día de intervalo, no se encuentran vibriones coléricos. Los convalecientes se consideran como no contagiosos, cuando tres análisis de excrementos, efectuados con 1 día de intervalo en cada uno, dán resultados negativos.

En II. 4. Los vibriones del agua pueden considerarse como coléricos, cuando la facultad de aglutinación, alcanza un grado determinado (v. más adelante) y el ensayo de Pfeiffer resulta positivo.

IV. COMPROBACIÓN DE LOS CASOS DE CÓLERA DIARRÉICO

Los casos de diarrea sospechosos de cólera, se comprueban por el análisis del suero sanguíneo. La sangría se hace por medio de una ventosa (v. pág. 154) con lo cual se obtiene por lo menos 1 c. c. de suero. Diluciones en solución al 0,8 % de sal común y en caldo, ensayo de la aglutinación con cultivos recientes de cólera y ensayo de la reacción Pfeiffer (véase también pág. 130 párrafo 4.) Este último es frecuentemente positivo, aun cuando falte la aglutinación.

Ensayo de la aglutinación: (Puede obtenerse suero

apropiado del «Instituto para enfermedades infecciosas» de Berlín.)

a) *En gota suspendida, con poco aumento:* El suero específico, debe mezclarse con solución de NaCl, al 0,8 ‰, en dos diferentes concentraciones (esto es, el límite inferior de acción y cinco veces múltiplo del mismo), pero que ambas produzcan á 37°, con los vibriones, una notable formación de montoncillos, á los veinte minutos lo más tarde. Se dispone como *control*, una preparación de suero normal de un animal de la misma especie, 10 veces más concentrado que el suero específico; en esta preparación no ha de haber aglutinación. Cultivos en agar, de menos de 15 horas, pueden dar con la sol. de NaCl una pseudoaglutinación, á causa de desmenuzarse difícilmente, quedan luego, no obstante, bacilos aislados. El ensayo de Pfeiffer lo determina luego!

b) *Determinación cuantitativa del poder de aglutinación:* Se hacen diluciones del suero específico en solución de ClNa (filtrada dos veces por un filtro compacto) al 0,8 ‰, en proporción de 1:50, 1:100, 1:1000, 1:2000. En un c.c. de cada una de estas diluciones, puesto en tubos (como en la pág. 108 b α) se deslíe 1 öse de cultivo sobre agar y se reparte homogéneamente y agitando el conjunto. Al cabo de 1 hora de permanencia á 37°, se observan á la luz del día, por refracción, con una lente (v. pág. 109); sólo puede considerarse como positiva, en caso de formación indudable de montoncillos; la aglutinación debe efectuarse en gradación regular sucesiva, hasta alcanzar el límite del título. En cada investigación se disponen como *control*: 1. Suero normal de un animal de idéntica especie que el que sirvió para obtener el suero específico. pero 10 veces más concentrado + el cultivo; 2. La solución de ClNa al 0,8 ‰ sola + el cultivo; 3 Cultivos puros de cólera de

la misma edad que el cultivo examinado + diluciones del suero específico.

Ensayo de Pfeiffer: (Se obtiene suero apropiado del «Instituto para enfermedades infecciosas», de Berlín; debe tener un título por lo menos de 0,0002 mg. ó sea que esta cantidad de suero, debe bastar para disolver al cabo de 1 hora con formación de corpúsculos, los vibriones contenidos en 1 öse = 2 mg., de un cultivo de cólera, de 18 horas y de virulencia constante, inyectados con 1 c. c. de caldo en el vientre de un cobaya.)

4. Cobayas A—D de unos 200 gr. cada uno, se inoculan. Los A—C reciben cada uno, 1 öse del cultivo sobre agar, que se examina, de 18 horas á 37°, en 1 c. c. de caldo inyectado en la cavidad abdominal (v. pág. 166); en el cobaya A vá mezclado además con suero específico, en cantidad 5 veces mayor que su título (por tanto 0,001); en el B con 10 veces el título (ó sea 0,002), en el C (comprobante) mezclado con 50 veces (ó sea 0,01) de suero normal, de un animal de idéntica especie que el productor del suero específico. El cobaya D recibe únicamente $\frac{1}{4}$ de öse del cultivo analizado, para ensayar intraperitonealmente su virulencia.

Se preparan gotas suspendidas, con el contenido intraperitoneal, á los 20 y á los 60 minutos. (Modo de hacer las tomas, v. pág. 104 α). En los cobayas A y B si el cultivo es de cólera, se verifica la disolución á los 60 minutos lo más tarde, en los cobayas C y D se encuentran numerosos vibriones en buen estado, y que se mueven vivamente.

Para el IV (casos de cólera diarréico) sirve el siguiente método: se hacen diluciones del suero humano en 20, 100 y 500 partes de caldo; se toma 1 c. c. de cada una de ellas, se les añade 1 öse = 2 mg. de un cultivo virulento, de 15 horas sobre agar, de vibrión colérico y se inyectan, cada uno de ellos en el peritoneo de 1 co-

baya de unos 200 gr. En caso de que á los 20 ó á los 60 minutos haya perceptible bacteriolisis, se acepta como caso de cólera pasado. Como comprobante, se inyecta $\frac{1}{4}$ de öse de cultivo en 1 cc. de caldo y sin suero, en el peritoneo de un cobaya de unos 200 gr.

Los vibriones coléricos, presentan un desarrollo muy característico sobre el llamado alcalialbuminatgelatina (Deycke). Puede adquirirse el alcalialbuminato de E. Merk-Darmstadt (100 gr. = 11 Mk.) ó preparado del modo siguiente: 1 kg. de carne de ternera, exenta de grasa y cortada en pequeños pedazos, se macera durante 48 horas en 1200 c. c. de solución de KOH al 3 %, calentada á 37° y luego se mantiene durante algunas horas á 60°-70°. Se filtra el jugo y se le añade HCl diluído hasta que no se forme precipitado. Se filtra para separar el precipitado y se disuelve éste, en corriente de vapor, en solución concentrada de carbonato sódico, hasta que esté ligeramente alcalino. Se evapora la solución, el residuo se deseca á 100° hasta que quede polvo. Con 2-3 gr. de este polvo ó del alcalialbuminat comercial y con 1 gr. de peptona, 1 gr. de NaCl 10-15 gr. de gelatina y 100 gr. de agua común se prepara gelatina. (Neutralización con HCl, alcalinización con carbonato sódico cristalizado al $\frac{2}{3}$ %.)

13. Bacilo de la peste bubónica

Véase la Instrucción del consejo federal para combatir la peste, Berlín 1906. Ricardo Schötz 0,60 M. 7 edición. El aprovisionamiento de cultivos vivos, de peste, así como las investigaciones científicas y los ensayos en animales, hechos con aquéllos, están limitados en Alemania á determinados laboratorios ya dispuestos

especialmente; en la práctica, se permiten únicamente las investigaciones de cultivos, para hacer el diagnóstico en casos sospechosos de peste.

Como materiales de investigación, en caso sospechoso de peste, se consideran preferentemente, la secreción y el pus de los bubones (obtenidos mediante jeringa ó por incisión), la sangre, los esputos y la secreción faríngea de los enfermos. Coloración con las soluciones generales. Para teñir los polos, se hacen preparaciones secas, fijadas 25 minutos en alcohol absoluta (ó mejor aún vertiendo el alcohol absoluto gota á gota y al cabo de 1 minuto, expulsar el residuo por el calor) y coloreadas (preferentemente con solución acuosa diluída de azul de metileno,) Siembras en agar, suero, gelatina (ligeramente alcalina; es el mejor medio para siembras de material impuro.) En general, el desarrollo es bastante lento (tardan 48 horas ó más en aparecer colonias visibles.) Bacilos pequeños, inmóviles, no toman el Gram, en el agar con 3 % de NaCl, se desarrolla con formas esféricas ó semejantes á levaduras, en el caldo forma cadenas, no hace fermentar el azúcar, no licua la gelatina. Patógeno para los ratones y cobayas y para otros animales según la clase de infección; es particularmente característica, la infección producida en los cobayas frotándolos en la piel afeitada previamente. Es aglutinable por el suero de animales inmunizados y por el de los convalecientes de peste.

14. Bacilo del tétanos

Movible por medio de cirros peritricos. Se desarrolla únicamente en ausencia de oxígeno (anaerobio). Para obtener cultivos puros con el pus tetánico obte-

nido de un sitio infectado (sólo allí se encuentran los bacilos en el cuerpo animal) se siembran con él, tubos de caldo, y se les hace pasar una corriente de hidrógeno (según la pág. 41, 4 a) y se ponen en la estufa. A las 24 horas ó con más seguridad á las 48, se han formado ya las esporas del tétanos, cosa que se comprueba por medio de preparaciones. Si se calientan los cultivos en baño de agua, á 80°, durante $\frac{3}{4}$ -1 hora, quedan únicamente vivas las esporas del tétanos (en caso de que simultáneamente no existan esporas muy resistentes de otras bacterias); por el procedimiento de las placas anaerobias, se pueden obtener con aquéllas, colonias aisladas y cultivos puros. Siembras con tierra, etc.; se inyectan subcutáneamente ratas y cobayas y con el pus obtenido del sitio inoculado de los animales, muertos en algunos días con síntomas tetánicos, se preparan cultivos como antes se ha dicho. Se desarrolla también á la temperatura ambiente, licua la gelatina.

Se tiñe con los colores generales de anilina, y también según Gram. Las esporas (en forma de cabecitas) se tiñen por los métodos de la pág. 73 y sigs.

15. *Bacillus pyocyaneus*

Se desarrolla en todos los medios de cultivo usuales. Las variedades típicas, producen una materia colorante soluble en el cloroformo, de color verde obscuro, que, poco á poco, se vuelve parda (pyocianina) y que falta en los bacilos fluorescentes análogos á éste. Patógeno para los conejos, cobayas y ratas. No toma el Gram.

16. Estafilo y Estreptococcus piógenos

Pueden cultivarse en los medios usuales. El desarrollo óptimo se consigue á la temperatura fisiológica. El *Staphylococcus aureus* y el *S. albus*, licuan la gelatina, el *Streptococcus* y el *Tetragenus* no la licuan. Los cuatro toman el Gram. Las cadenas de streptococcus, se obtienen preferentemente en los medios líquidos (y también en el agua de condensación del agar).

Análisis de la sangre en casos de septicemia y piemia: La sangría se hace en la vena mediana, mediante jeringuilla (v. pág. 154). Se siembran, rápidamente, en 6 tubos de agar fundido y á unos 42°, 2-3 c. c. de sangre en cada uno. Se vierten en placas, las cuales se mantienen en la estufa á 37°, invertidas, durante 1-4 días. Se presentan:

El *Streptococcus pyogenes seu erysipelatis*, colonias pequeñas claras, con una corona también clara (Hemolisis).

El *Streptococcus mitis seu viridans* (se encuentra raras veces); colonias muy pequeñas verdosas, enturbia el agar glucosado, ligeramente patógeno para los animales.

El *Streptococcus mucosus*, colonias finas, verdes y mucosas. (Se encuentra muy raras veces. Se presenta muchas veces en la pneumonía.) Muy patógeno para los animales.

Los *Staphylococcus pyogenes*, colonias exuberantes con el borde claro.

Los *Gonococcus*, colonias pequeñas negruzcas.

Y *Pneumococcus*, lo mismo.

17. Pneumococos

Para obtener cultivos puros con gran facilidad, basta inocular subcutánea ó intraperitonealmente á un ratón ó á un conejo, un esputo pneumónico, y sembrar sobre agar ó suero, la sangre del animal muerto al cabo de unas 48 horas, á consecuencia de la llamada «septicemia de los esputos». También pueden obtenerse cultivos en idéntica forma, mediante la saliva de muchos hombres sanos. Desarrollo óptimo á la temperatura fisiológica (en forma de pequeñas gotas de rocío), no se desarrolla á menos de 20°. Es preciso renovar los cultivos cada 6-8 días, porque mueren frecuentemente. En la sangre (v. pág. 35, al final) se conservan vivos los pneumococcus durante meses.

El Pneumococo (de A. Fränkel) se puede teñir por los métodos generales de coloración y además toma el Gram, el pneumobacilo (de Friedländer) no lo toma. Este último se desarrolla á la temperatura ordinaria, en cultivo por picadura sobre gelatina, en forma de clavo, sobre el agar en forma de capas viscosas de un blanco vítreo. Son mayores que los pneumococos, tienen forma de bacilos. Inyectados subcutáneamente á los ratones, producen igualmente la septicemia. Es posible en ambos, la coloración de cápsulas, en preparaciones directas del cuerpo animal (Métodos, v. pág. 72).

Los pneumococos se distinguen de muchos streptococos piógenos, sólo por su forma, análoga á la llama de una bujía, por su tendencia á formar diplococos con cápsula, en el cuerpo animal, la formación de cadenas muy cortas en los medios líquidos. Véase además la página 134 en el núm. 16.

18. Meningococos

(*Cocos de la meningitis cerebro-espinal epidémica*)

Se desarrollan bien únicamente á más de 25°. Para hacer siembras con material procedente del cuerpo (pus cerebral, líquido cerebro-espinal, mucosidad nasal y faríngea, v. pág. 155), se emplea preferentemente el agar-ascítico (y también el agar suero, agar sangre, véase págs. 24 y 154, y además suero de Loeffler, véase página 24); para resiembra en generaciones ulteriores también se emplea el agar. En el caldo produce enturbiamiento y copos. La primera generación es delicada, las posteriores son exuberantes. Los cultivos deben conservarse en cámara húmeda, en la estufa á 37°, porque sino su vitalidad se amortigua, muchas veces rápidamente. Debe sembrarse diariamente al principio, y cada 5-7 días después. Se tiñe preferentemente por el procedimiento de la pág. 139, núm. 2. No toma el Gram. Es de forma análoga á los gonococos; muchas veces está incluído, como éstos, en células, formando diplococos. Es ligeramente patógeno (tóxico) para los animales (ratones y cobayas) intraperitonealmente. El suero de los enfermos aglutina por regla general (actuando á más de 1 : 50). Para el diagnóstico en los cultivos, se hace la aglutinación con suero de animales inmunizados.

El *Micrococcus catharralis*, que se encuentra en la nariz y en la faringe, es análogo en la forma al meningococo y tampoco toma el Gram, pero se desarrolla bien en el agar ordinario y también en la gelatina (sin licuarla), y puede diferenciarse de todos los demás, como todos los cocos análogos, por el ensayo de la aglutinación.

19. Gonococos

No pueden obtenerse cultivos en los medios ordinarios, por lo menos en la primera generación; algunas veces, sin embargo, se llegan á obtener cultivos, aunque poco desarrollados, con las generaciones posteriores. Se emplean los siguientes medios de cultivo, en los cuales el gonococo se desarrolla á los 36°, formando colonias finas semejantes á gotas de rocío (conviene no tomar temperaturas superiores):

1. *Suero de sangre humana coagulado de Bumm*
Después de efectuar la ligadura del cordón umbilical en el parto, doble ligadura como se acostumbra, y una vez separada la porción de aquél, situado entre estas, se desinfecta el extremo unido á la placenta y se corta por encima de la ligadura. Por las contracciones ó comprimiendo el útero se evacua sangre que se recoge en vasijas estériles y se prepara luego como la sangre de animales (v. pág. 22). También puede exprimirse manualmente la placenta después de expulsada. Se hacen siembras fraccionadas de pus gonocócico. Los cultivos quedan raquíticos.

2. *Agar mezclado con suero de sangre humana, Wertheim.* Se siembra el material gonocócico, en un tubo que contenga 1 c. c. de suero humano (obtenido como en el núm. 1) líquido y calentado á 40° y con él, se preparan diluciones en otros dos tubos que contengan el mismo substrato, calentado á igual temperatura. El contenido de cada uno de estos últimos tubos, se mezcla con unos 2 c. c. de agar licuado y enfriado á poco más de 40° y la mezcla se vierte rápidamente en cápsulas, se deja solidificar y se pone en la estufa. Es pre-

ferible efectuar la siembra por frotos, en la superficie del medio solidificado. Las colonias, mayores que en el número 1.

3. *Agar ascites* según *Kiefer*. El agar preparado con agua de carne neutralizada, que contenga 3,5 % de agar, 5 % de peptona, 2 % de glicerina, 0,5 % de NCl se licua y se enfria á unos 50° y se mezcla $\overline{a a}$ con líquido ascítico á la misma temperatura, vertiendo la mezcla en cápsulas Petri ó en tubos que se solidifican en posición inclinada. La germinación por siembras fraccionadas. Si el líquido ascítico es muy alcalino, se emplea el agar sin neutralizar ó bien acidulado á fin de que la mezcla resulte ligeramente alcalina.

4. *Agar recubierto de sangre*, según *Abel*. Se siembra sobre agar recubierto con sangre obtenida asepticamente, desinfectando el sitio de la incisión y separando el desinfectante de la piel del paciente por medio de agua y algodón estériles. La primera generación no siempre va bien; es recomendable por la sencillez de su preparación, para la resiembra.

5. *Medios á base de nutrosa* según *Wassermann*. Se mezclan en un matríz 15 cc. de suero de cerdo, 30-40 c. c. de agua, 2-3 c. c. de glicerina y 0.8 gr. de nutrosa, se hierve durante 15 min. agitando constantemente. Al día siguiente se repite la ebullición (y agitación!) durante 15 minutos. Este líquido se tiene de reserva, y par usarlo se calienta á 50° — 60° , se mezcla $\overline{a a}$ con agar-peptonado al 2 % á la misma temperatura, se vierte en cápsulas y se efectúan siembras fraccionadas. Recomendable en especial para las resiembras.

Para examinar si las colonias desarrolladas, son verdaderamente de gonococos, se hacen

α) Preparaciones por el método ordinario de Gram (los gonococos se decoloran por el Gram, en oposición

la mayor parte de los demás cocos; v., sin embargo, pág. 136, núm. 18).

β) Siembras sobre agar ordinario. Si se trata de gonococos, el desarrollo se retarda (por lo menos de los individuos aislados recientemente, v. primera conclusión de este capítulo).

γ) Inoculaciones en animales (ratones, conejos; el gonococo es tóxico sólo á dosis elevadas).

La *coloración* de los gonococos en las preparaciones de pus, etc., (formas en diplococo, situado en la mayor parte de los casos dentro de células de pus) se efectua con los colores ordinarios de anilina ó, con el fin de obtener una coloración de contraste con los elementos de los tejidos, se siguen también los siguientes métodos:

1. Con las soluciones de azul de metileno y eosina citada en la pág. 65 apart. II y III. Los gonococos y los núcleos celulares quedan azules, el resto de los tejidos queda rojo.
2. *Según Loeffler* D. m. W. 07. núm. 5.
 1. Fijar los frotos en alcohol absol. + éter \overline{aa} .
 2. Teñir con la sol. 1, pág. 97, párrafo 1, en caliente.
 3. Lavar con agua.
 4. Decolorar con alcohol absol. 177 + 20 de sol. acuosa al 1 $\frac{0}{100}$ de Bromoeosina B extra Höchst + 3 de ácido acético.
 5. Lavar con agua. Gonococ. azul oscuro núcleos, azul pálido, células, rosa pálido.
3. *Según Giemsa*. (V. pág. 150).
4. *Según A. Neisser*:
 1. Teñir en solución alcohólica saturada de eosina, en caliente y durante algunos minutos.

2. Se absorbe la eosina con papel de filtro y en seguida.
3. Cubrir la preparación con sol. alcohólica saturada de azul de metileno ($\frac{1}{4}$ min.)
4. Lavar con agua.

Gonococos y núcleos quedan azules, tejidos rojos.

5. *Según Pappenheim:* Se tiñe durante 1 min. con una solución de verde metilo (unas 2 veces la cabida de la punta de un cortaplumas) y pyronina (de Grüber. Leipzig) (la mitad de dicha cabida) en 5 c. c. de agua destilada. (La solución debe ser azul-violeta, se ensaya cual sea la mejor mezcla). Lavar con agua. Los gonococos quedan rojos, los núcleos azules.

Las secreciones que contienen pocos gonococos (procedentes de gonorreas antiguas) se disponen en frotos (pág. 54.) Sobre el portaobjetos, se tiñen según Gram. (Los gonococos toman el color de contraste—en cada coloración se lava con agua y luego con alcohol hasta decoloración.) Han de efectuarse repetidas investigaciones.

20 Actinomicetes

Producen cultivos sobre los medios ordinarios, con preferencia en el agar glicerinado. Muchos cultivos se forman también anaerobiamente, ya que muchas veces se desarrollan únicamente en ausencia de aire. El crecimiento es lento en la primera generación, en las ulteriores, es robusto. Las colonias aparecen secas, sólidamente adheridas al medio y hundidas á modo de co-

rrosiones, luego quedan como si se hubiese rociado el medio con lechada de cal ó con amarillo pulverulento.

Se desarrollan también en gelatina á la temperatura ambiente, licuan ésta y el suero (siempre ?) (No se producen mazas en los cultivos.) Las drusas procedentes de pus, pueden desmenuzarse previamente en un mortero de ágata, esterilizado, para facilitar las siembras.

Se pueden colorear por los métodos ordinarios más sencillos, sin embargo no se reconocen muy bien en los cortes; son preferibles las coloraciones por contraste:

a) Según *Gram* (v. pág. 66.) Se tiñen los cortes durante 24 horas. (Según *Loeffler* se mantiene previamente la preparación en solución de potasa al 0,01 ‰, durante algunos minutos.) Luego 15 minutos en ioduro potásico. Coloración de contraste con la vesubina ó la eosina.

b) Según *Weigert* (v. pág. 70).

c) Según *Weigert*, con *orchilla*.

1. Teñir en una solución rojo-obscura de *orchilla*, en 20 c. c. de alcohol absol. 5, de ácido acético, 40 de agua destilada. De 1 á 24 horas.

2. Lavar con agua.

3. Teñir en solución acuosa al 1 ‰, de violeta de genciana.

4. Aclarar con aceite de cedro.

Los núcleos celulares quedan de color azul violado, los tejidos anaranjados, las drusas de actinomicetes de azul descolorido, en la parte interna y rojo rubí al exterior y entre ambos queda frecuentemente una zona incolora.

N. B. La *orchilla* debe dejarse, antes de usarla, en contacto del aire durante algún tiempo, para que quede exenta de amoníaco.

d) Según *Israel*.

1. Se tiñen los cortes, durante varias horas, en una solución concentrada de orceína, en agua acidulada con ácido acético.

2. Lavar con agua, luego se disponen sobre una espátula y se absorbe el agua mediante papel de filtro y

3. Se tienen en alcohol absol. durante algunos segundos.

4. En seguida se disponen sobre el porta-objetos, se desecan comprimiéndolos con papel de filtro y se acaban de secar al aire.

5. Bálsamo del Canadá.

Si se quieren tener teñidos únicamente los hongos y no los tejidos, puede dejarse actuar más tiempo el alcohol absoluto. La coloración resulta análoga á c.

e) Según *Boström*.

1. Teñir con solución acuosa de violeta de genciana anilinado.

2. Sin lavar se pasa á una solución de picrocarmín (de Weigert v. pág. 72).

3. Lavar con agua.

4. Decolorar en alcohol absol., hasta que los cortes queden de color amarillo rojizo.

5. Aclarar en aceite de cedro. Bálsamo del Canadá.

El centro de la drusas azul pálido, las mazas rojas, los tejidos amarillo rojizos.

21. Levaduras y Aftas

Cultivan en medios azucarados, débilmente ácidos; con preferencia en la cerveza no fermentada ó en un

cocimiento de ciruelas pasas ó en el mosto de uvas + Agar, bien esterilizados ó en agua corriente + gelatina sin ulterior adición. Aislamiento por el procedimiento de las placas (v. pág. 30 y siguientes) ó bien disponiendo cultivos unicelulares como sigue:

Se diluye mucho en gelatina, se dispone una gota suspendida, se observa con poco aumento el sitio donde existen células aisladas y se señala éste, mediante un punto de tinta, puesto en el sitio correspondiente de la cara superior del cubre-objetos, se siembra con las colonias desarrolladas en dicho punto.

Coloraciones mediante los colores de anilina ordinarios.

Las esporas se tiñen con fuchsina fenicada á la ebullición, luego se lavan con ácido sulfúrico al 4 % y se tiñe la substancia celular por contraste, mediante solución de azul de metileno.

Coloración de los *núcleos* según *Möller*: 1. Se inmergen las preparaciones, por lo menos durante 2 horas, en una solución de sulfato de hierro amoniacal al 3-4 %. 2. Enjuagar con agua. 3. Teñir durante 1/2 hora en una solución saturada de hematoxilina, en agua común. 4. Lavar con agua. 5. Diferenciar en la solución 1, durante 1/2-2 minutos, comprobando frecuentemente en el microscopio. 6. Lavar con agua. Se deja secar al aire. Montar en bálsamo del Canadá.

Reconocimiento de las levaduras en los tejidos organizados según *O. Busse*: 1. Teñir durante 15 minutos en solución de hemateína. 2. Lavar con agua, 15 minutos. 3. Teñir con fuchsina fenicada de Ziehl (pág. 62) al 1-20 de agua, durante 1/2-24 horas. 4. Diferenciar en alcohol de 60 %, en alcohol absoluto, aceite de cedro, etc. Los núcleos celulares quedan azules, las levaduras (no todas!) aparecen de color rojo claro brillante.

22. Mohos y otros hongos

Para cultivar los mohos, se emplean los medios de cultivo usuales para las bacterias, especialmente los ácidos, la papilla de pan (pág. 27) y los substratos citados en el número 21, al tratar de las siembras de las levaduras: De entre los mohos más comunes, la mayor parte de los *Penizillium*, se desarrollan á la temperatura ambiente, algunos *Aspergillus* y varias especies de *Mucor*, á la temperatura fisiológica; una parte de estos son patógenos para los conejos en inyección intravenosa.

Para el análisis microscópico, se observa al microscopio en primer término, si es posible, el hongo junto con el medio en que se desarrolla, con pequeño aumento, luego una parte del hongo colocado entre un cubre y un portaobjetos, sin añadir agua á la preparación. Si se quiere observar incluído en un líquido, un hongo desarrollado al aire, no se emplea el agua porque esta lo moja imperfectamente, sino que se humedece primero sobre el portaobjetos con una mezcla de: Alcohol y Líq. Ammon. cáust. $\overline{a a}$, 25, glicerina 15, ag. dest. 35 (ó también con 1 de gelatina; ésta se ha de disolver primero en agua, calentando); pueden conservarse las preparaciones rodeando el borde del cubreobjetos con barniz ó lacre. También pueden guardarse las preparaciones en gelatina glicerinada (v. pág. 174).

Para teñir los mohos, se emplean los colores básicos de anilina, para la coloración en cortes, por ejemplo, la sol. de azul de metileno de Loeffler (v. pág. 62).

Los *parásitos de la piel* (*Favus*, *Tricophitos*, etc.) se pueden cultivar sobre gelatina y agar y se tiñen

como las bacterias. Para aislarlos es conveniente desmenuzar las costras, cabellos, etc., con tierra de infusorios calcinada y fría, en un mortero estéril, disponer placas y hacer siembras de aquellas colonias, en las que se haya comprobado por el microscopio, que proceden del desarrollo de una sola espora. En caso necesario, se inmerge el material analizado, antes de la siembra, en alcohol al 50 % ó más concentrado, hasta el absoluto y durante 1-24 horas. Con esto mueren todas las bacterias ó la mayor parte, mientras que los hongos sobreviven en su mayor parte. Muy sencillo y de buenos resultados es el procedimiento de siembra *in situ* según Plant: Se ponen algunos cabellos enfermos ó algunas escamitas de piel, sobre un porta-objetos esterilizado y se aplastan con otro porta-objetos estéril también, se separan luego y se cubre el material con un cubre-objetos estéril, que se fija por los bordes mediante gotitas de cera. Debe evitarse toda adición de agua! Se colocan en una cámara húmeda (tan húmeda, que una etiqueta pegada al porta-objetos pueda separarse fácilmente á las 24 horas). Los hongos se desarrollan bien. Al cabo de algunos días se hacen siembras del borde de la vegetación formada por el hongo, en placas de gelatina ó agar, etc.

23. Amibas

Son posibles los cultivos de muchas especies (que habitan en el agua, en la tierra y también en los intestinos). Se ensayan en los siguientes substratos:

1. *Medios á base de heno ó paja.* 20-40 gr. de heno ó paja, se hierven en un litro de agua común durante media hora. El líquido filtrado, se alcaliniza

ligeramente con carbonato sódico, se hierve y se filtra. Añadiendo un 1 $\frac{1}{2}$ 0/0 de agar antes de neutralizar se puede convertir el medio en sólido.

2. *Substrato con Fucus crispus*: Se prepara con caldo ó con agua corriente añadiendo 5-15 0/0 de *Fucus crispus*, hirviendo hasta disolución (largo rato!) y alcalinizando (á 10 cc. de medio de cultivo, se les añade 1 c c. de KOH $\frac{1}{10}$ normal).

3. Los medios de cultivo usuales para las bacterias y también la combinación siguiente: Agar 0,5, agua corriente 90,0, caldo ordinario alcalinizado 10,0.

No es posible obtener cultivos puros, siempre deben existir bacterias, de las cuales se alimentan las amibas. Tratando las mezclas de cultivos, en los que no se encuentren ni esporas de bacterias, hongos ni levaduras y en los que las amibas forman masas cistiformes, por una solución de carbonato de sosa anhidro al 20 0/0 (v. pág. 17, al principio), durante unas 72 horas, mueren todas las bacterias; los cistos amiboideos no se desarrollan, pues, sobre los medios ordinarios estériles, pero lo hacen bien si sobre dichos medios existen cultivos de bacterias que pueden servirles de alimento. (Por tanto los cultivos de una especie amiboidea, es posible sólo hacerlos junto con una determinada especie bacteriana.)

El análisis se hace con preferencia en el líquido natural, reciente, en caso necesario se le adiciona sol. de NaCl al 0,8 0/0. Para teñir se fija antes en 2 de sol. acuosa saturada de sublimado corrosivo (2 gr. en 30 de agua, hervir, filtrarlo después de frío) + 1 de alcohol absol. La preparación, húmeda todavía, se sumerge durante algunos segundos en ella! Se lava luego, durante 30 min., con alcohol de 60 0/0, adicionado de iodo, hasta que tenga color pardo; se guardan en alcohol de 70 0/0. Antes de teñir se lava con agua. Se tiñe con

picrocarmín (pág. 72 *b*) $\frac{1}{2}$ -1 hora, en frío, se lava con alcohol de 70 % + 0,1 de HCl %. La coloración de contraste con sol. acuosa diluída de verde-luz. Luego alcohol absol., aceite de cedro, etc.—Los fragmentos de tejidos (en la disentería de los trópicos) se fijan con alcohol + sublimado (v. antes) $\frac{1}{2}$ hora, se lavan en alcohol iodado (v. antes) 24 horas, alcohol absol., xilol, inclusión en parafina. Los cortes se tiñen como las preparaciones recientes (v. antes).

24. Esporozoos de la malaria

Se disponen frotos con la sangre (v. pág, 155). Si existen pocos parásitos: Se extiende una gota grande de sangre sobre el cubre-objetos, se deja secar al aire, se inmerge durante algunos minutos, en una mezcla $\overline{a a}$ de formalina al 2 % y ácido acético al $\frac{1}{2}$ %. De este modo se separa la hemoglobina. La coloración se hace por uno de los siguientes métodos:

a) Coloración sencilla según Manson

Se disuelven 2,0 de azul de metileno, med. pur. Höchst y 5,0 de borax, en 100 de agua destilada hirviendo. Para teñir, se diluye en agua hasta que la solución, puesta en un tubo de ensayos, aparezca transparente. En las preparaciones secas, recientes, basta teñir en frío, durante unos 10-15 segundos.

Las preparaciones antiguas, se tiñen mejor con una sol. de 1, de azul de metileno, 0,2 de carbonato de sosa cristalizado, en 100 de agua, durante un momento ó hasta 20 segs. y sin calentar. Lavar con agua. Los parásitos quedan azules, los glóbulos rojos, verdosos.

b) *Doble coloración*, según *Loeffler*, según el método de la pág. 97.

c) *Coloración de la cromatina según Giemsa* (modificación del método Romanowski-Nocht). *Ctrblt. f. Bakt. Or.* 37 pág. 308.

1. Se fijan los frotos en alcohol etílico, durante 15-20 min. ó en alcohol metílico (sólo 2-3 min!). Absorber el líquido con papel de filtro.

2. Teñir con la «Solución de Giemsa para la coloración Romanowsky» preparada por el Dr. Glüber (Leipzig). Se llena un frasco cuentagotas con la solución (antes de llenarlo debe enjuagarse con alcohol absoluto!) y mediante aquél, se añade á una serie de tubos de ensayos, anchos, que contienen 1 c c. de agua á 30-40°, una gota de la solución colorante á cada uno y se agita. (Los cubres con las preparaciones se sumerjen durante 10-15 min. en pocillos, que contienen la solución diluída inmediatamente antes.)

3. Lavar con un fino chorro de agua.

4. Desecar, montar en bálsamo del Canadá. La cromatina de los parásitos queda rojo vivo, protoplasma azul, núcleos leucocitarios de rojo á violeta, protoplasma azul, glóbulos rojos de rosa á rojo pardo. Se emplea para teñir cortes.

25. Tripanosomas

Se examinan en vivo en la sangre, en gota suspendida, + un poco de sol. de NaCl, al 0,8 % ó bien extendiéndola entre el cubre y el porta objetos (untando el borde con vaselina ó con cera). Preparación de frotos con sangre, v. pág. 155. Coloración según *Giemsa* (v. antes, c) ó según *Loeffler*: Preparaciones por

frotos muy finos, fijar con alcohol absol. + éter $\overline{a a}$. Colocar sobre el cubre 3 gotas de sol. de arsenito sódico al 0.5 ‰, en agua destilada + 1 gota de sol. de la sal doble verde malaquita + cloruro de zinc, al 0,5 ‰, en agua, calentar hasta que se desprendan vapores 1 min. Lavar con chorro fuerte de agua. Se mezclan en un tubo de ensayos, 5 c. c. de una mezcla de 0,5 de glicerina purísima y 100 de ag. dest., con 5-10 gotas de sol. Giemsa-Romanowsky (v. pág. 148, c), se calienta hasta ebullición y se vierte, caliente, sobre el cubreobjetos. A los 1-5 min. se separa y se lava con chorro fuerte de agua. (La mezcla de glicerina-Giemsa puede utilizarse siempre, de nuevo.) Plasma de los tripanosomas, azul; núcleos, membrana ondulante y cirro, rojos; critrocitos rosa.

La germinación del tripanosoma de las ratas, es posible en el agua de condensación de una mezcla de agar + sangre de conejo desfibrinada $\overline{a a}$. Sembrar abundantemente, y mantenerlo á 37°.

26. Espiroqueta de la sífilis

La espiroqueta de la sífilis se distingue de otras especies, por ser relativamente difícil de teñir, por su extraordinaria finura y por su forma; son de notar en ella numerosas (10-26) sinuosidades, aun estando en reposo, y sus extremos son ambos muy afilados. Se puede observar bien en vivo, por la iluminación lateral en campo oscuro. Imposible hacerla germinar.

Para teñir frotos, en lugar de los métodos generales de coloración, en los que el colorante tendría que actuar durante horas (no toma el Gram), se emplean los siguientes:

- a) Según Giemsa (D. m. W. 05 nr. 26, 07 nr. 17):
1. Frotos hechos del borde de un chancro que no esté en tratamiento, ó de una pápula, sobre un porta, extendiendo con el canto de otro portaobjetos.
 2. Fijar en alcohol, ó á la llama, con cuidado. En las preparaciones antiguas, no es necesario fijar.
 3. Teñir como en la pág. 148 c, 15-60 min., en frío; en el nr. 2, de allí hay que añadir al agua 1-10 gotas de sol. de Na_2CO_3 al 1 %, antes de añadir la sol. colorante.
- O bien, coloración rápida: Con la sol. de la pág. 148 c 2, se cubre la preparación, se calienta hasta que emita vapores, $\frac{1}{4}$ min. en reposo, se separa, se separa, se vierte nueva sol., y así repetirlo hasta cuatro veces; la última vez se deja actuar el colorante 1 min.
4. Se lava muy poco con agua acidulada. Las espiroquetas quedan de color rojo intenso. el fondo ligeramente rojizo ó incoloro, las células azules, los núcleos rojos, los eritrocitos rosa.
- b) Según *Loeffler*: Como en los tripanosomas (v. pág. 148, al final).
- Para teñir los cortes, según *Levaditi* (Hoffmann, D. m. W. 06, nr. 22):
1. Los fragmentos de órganos de 2 mm. de grosor, á lo más, se fijan durante 24 horas en formalina 1 + 9 de agua.
 2. Se pasa á alcohol de 96 % unas 15 horas.
 3. Al agua destilada hasta que los cortes ó discos se sumerjan. El agua se cambia muchas veces.
 4. Se suspenden los discos por medio de

- hebras de hilo en una mezcla, *reciente*, de 90 c. c. de sol. de Ag. NO₃ al 1,5 % + 10 c. c. de piridina purísima, puesta en un frasco obscuro, con tapón esmerilado, y teniéndolas 3 horas á la temperatura ambiente y 3 horas á 45°-50°, en estufa de parafina (pueden dejarse también en esta solución hasta 6 días!)
5. Pasarlos (después de lavar con sol. de piridina al 10 %) á una mezcla reciente de: 90 c. c. de sol. de pirogalol al 4 % + 10 c. c. de acetona; de ésta se toman 85 c. c. + 15 c. c. de piridina purísima. En frascos oscuros, con tapón esmerilado, 15 horas (también hasta 2 días).
 6. Lavar en agua, en el alcohol diluído, luego en alcohol absoluto, xilol, incluir en parafina, cortar, y sin otra coloración observar. Las espiroquetas negras por la plata reducida.

27: Espiroqueta de la fiebre recurrente

Examen en vivo y coloración como la de la sífilis. La sinuosidades son menos profundas. Son muy abundantes en la sangre en los casos graves. No es posible la germinación. Por el contrario, la espiroqueta de los dientes germina anaerobiamente á 37°, sobre suero de caballo 1 + 2 de agar; á los 10 días forma colonias hinchadas.

28. Corpúsculos de la rabia canina

Reconocimiento de los corpúsculos de Negri, según *Lentz*:

1. Se hacen cortes algo gruesos de las *astas* de *Amon* de 2-3 mm. de grueso, se fijan según el método de la pág. 58, se endurecen y se incluyen. Los cortes se desecan sobre portaobjetos (pág. 56, nr. 3) y luego 1 min. en alcohol absol.
2. Teñir con sol. de eosina extra B. (Höchst) 0,5 en 100 de alcohol de 60 %.
3. Lavar con agua.
4. Teñir con azul de metileno de Loeffler (pág. 62) 1 min.
5. Lavar con agua, secar con papel de filtro.
6. Diferenciar en alcohol absolutiss. 30 + 5 gotas de una solución al 1 % de Na OH en alcohol absolutiss., hasta que quede un color rosa pálido.
7. Diferenciar en alcohol absoluto 30 + 1 gota de ácido acético al 50 %, hasta que las filas de células ganglionares aparezcan sólo como líneas de color azul claro.
8. Lavar corto tiempo, con alcohol absol., xilol, etc.

Los corpúsculos de Negri quedan de color rojo carmesí, sus corpusculillos internos azules, las células glanglionares y los núcleos azul claro, sus corpúsculos nucleares negro-azulados, los eritrocitos rojo cianabrio.

También pueden separarse, en un corte transversal de la *asta de Amon*, las células ganglionares, mediante un escalpelo, comprimirlo entre dos portaobjetos, fijar el frote, todavía húmedo, en alcohol metílico algunos minutos, lavarlo con alcohol absoluto y teñir como antes.

VII

Modo de efectuar la toma del material analizable, en el cuerpo animal

Los líquidos orgánicos, secreciones, excreciones, etcétera, que deben examinarse bacterioscópicamente, deben tomarse y conservarse de modo que no se contaminen por los gérmenes de la atmósfera y no deben ponerse en contacto con desinfectantes.

1. *Sangre*. En pequeñas cantidades, puede obtenerse del lóbulo de la oreja ó del lado interno del antebrazo, también puede recogerse bien de la cara flexora de los dedos (no es recomendable el obtenerla de la yema del dedo, porque ésta se limpia con dificultad y la herida que es necesario producir para la sangría, causa molestia). Debe lavarse la piel con agua y jabón (ó con espíritu de jabón) luego con alcohol, éter y algodón. Debe frotarse bien, para obtener así acumulación de sangre en la piel. Se deja secar y luego se punza con una aguja estéril ó con una lanceta. Se recoge la sangre en tubos estériles ó en cápsulas ó bien se hace ascender en tubitos capilares (se cortan de unos 6-8 cm. de largo y 2 mm. de diámetro y se hacen romos los bordes, por fusión, después de introducir la sangre se cierran con lacre ó con cera. El método de los capilares, es particularmente útil para obtener sangre, para efec-

tuar la reacción de Widal en el tífus, etc.). El suero se separa por sí solo (en la nevera), eventualmente es necesaria la centrifugación para separarlo. Para obtener el suero, se corta el tubo capilar en la capa de separación del suero y el coágulo (raspándolo con la lima) y se pone el extremo abierto, en contacto con la punta de una pipeta de 1 c. c. dividida en centésimas por la cual asciende el suero por sí mismo. Se reúne el de varios capilares, se pasa luego á un tubo y se diluye convenientemente. Luego se procede como se dijo en la pág. 116, al tratar del b. tífico.—Las heridas de la piel, deben cubrirse con algodón estéril y con esparadrapo.

La sangre en grandes cantidades, se obtiene por medio de ventosas en la espalda, se limpia la piel como antes se dijo, se aplica la ventosa seca y esterilizada por calefacción sobre la llama; se hace una incisión con un bisturí estéril, se aplica de nuevo la ventosa y después de la sangría se tapa la herida con algodón estéril: *ó de la vena mediana* (limpiando la piel como antes, *rodeando con la ligadura* de Esmarch, la parte superior del brazo, de modo que produzca la hinchazón de las venas, sin que deje de notarse el pulso radial sin embargo, se introduce la jeringuilla (es recomendable la de cristal de Luer) en la vena mediana, y estando colocada de modo conveniente la sangre asciende por sí sola en su interior). Se reparte la sangre, todavía líquida, en agar licuado y caliente á 42° (v. pág. 134, párrafo 16). Si no se trata de analizar el contenido bacteriano de la sangre, sino de emplearla como medio de cultivo, se añade la sangre al agar, al 1:3 y más conveniente aún á gran cantidad de caldo (v. también páginas 93, 99 y 138 n.º 4.)

Obtención de sangre placentaria (v. pág. 137 Gonococos 1.)

Las sangrías en los cadáveres, se hacen preferente-

mente en el corazón, con la jeringa, después de hacer una escara en la superficie del mismo, con un bisturí enrojecido, en el sitio de la incisión.

Para disponer preparaciones de sangre, destinadas al análisis microscópico, se moja el borde de un cubre-objetos esterilizado á la llama, en la gota de sangre obtenida mediante un pinchazo y con aquél, se extiende simultáneamente en la superficie de varios cubres ó porta-objetos. La capa de sangre ha de ser homogénea y delgada. Fijación y desecación, mediante el alcohol absoluto ó alcohol + éter $\overline{a a}$ desde $\frac{1}{4}$ á 24 horas, ó también estando todavía húmedas, con vapores de ácido ósmico (v. pág. 52, lo más corto posible, porque disminuye la facultad de teñirse; lavar luego con KMnO_4); la fijación en la llama, produce deformaciones de los eritrocitos.

2. *Pus.*—Se obtiene por incisión ó punción asépticas y se recoge en vasijas estériles (tubos ó placas). Pus en pequeñas cantidades, se obtiene por medio de un tubito de vidrio estirado en punta capilar y tapado en su parte superior con algodón estéril, guardándolo luego, si es necesario transportarlo, dentro de un tubo de ensayos, en el que se hace sostener, fijándolo con el tapón de guata.

3. *Secreciones y falsas membranas de la garganta.*—(Angina, difteria.) Tóquese en las partes enfermas mediante una öse de platino ó con el extremo limado de una varilla de vidrio esterilizada, con un poco de algodón estéril, colocado en el extremo de un palillo de madera ó de un alambre ó con una esponjita estéril sujeta con unas pinzas. Se tienen de repuesto, una serie de tubos de ensayo, convenientemente estériles, cerrados con tapones de algodón estéril, en los cuales se guardan la varilla de vidrio ó el alambre con la torunda de algodón, sujetándolos por medio del tapón del

tubo, de modo que el fragmento que aquellos llevan adherido, quede libre en el interior. Después de los toques en los órganos de la faringe, se coloca la varilla, en caso de no poder efectuar la siembra en seguida, otra vez en el tubo y se fija en el interior del mismo, por medio del tapón de guata. Si se prefieren los fragmentos de esponja para hacer los toques, se preparan de repuesto pedazos del tamaño de guisantes, que se esterilizan cubriéndolos antes, cada uno por separado, con papel encerado, se cogen para hacer los toques con las pinzas del estuche de bolsillo y se guardan cargadas de material dentro la envoltura de papel, hasta que se efectúen las siembras.—La *secreción nasal* se obtiene mediante una öse de platino ó con pinzas curvas y algodón estéril y empleando el espejo nasal.—La secreción de la cavidad posterior de las fosas nasales se toma mediante un alambre flexible y por la boca.—El alambre se guarda en un tubo de ensayos estéril, antes de emplearlo se dobla mediante unas pinzas estériles, en la forma deseada y luego de efectuada la toma se endereza otra vez, introduciéndolo después de nuevo en el tubo.

4. *Espustos*. Se recogen, exentos en cuanto sea posible de parte mucosa, en vasijas estériles (ó por lo menos perfectamente limpias, que pueden contener agua estéril, pero no ningún desinfectante).

5. *Heces fecales*. Se recogen en vasijas limpias, sin desinfectantes. En caso necesario se pueden recoger directamente del ano, con un instrumento apropiado y estéril. Si se desea analizar las partes mucosas (v. pág. 120 y 123) deben desleirse las deposiciones en una cápsula con agua estéril.

6. *Orina*, Se tiran las primeras porciones y se recoge el resto en matraces estériles. También puede recogerse por medio de sondas estériles. Para el análisis, se centrifuga en caso necesario.

7. *Ex—y Transudados* Se obtienen mediante punción, con una jeringuilla ó un trocar estériles, después de desinfectar la piel; el líquido cerebroespinal por punción lumbar. Para el análisis se centrifuga si es necesario—medios de cultivo apropiados (v. pág. 22, 23 y 138, apartado 3.)

VIII

Análisis bacteriológico del agua, del aire y del suelo

Análisis del agua

Toma de las muestras de agua: El agua de pozo extraída por medio de una bomba, se recoge en tubos de ensayo estériles (después de llamear el borde de la boca de salida) colocándolos junto á la salida del agua y después de largo tiempo de funcionar la bomba. En los pozos abiertos, fuentes y aguas corrientes, etc., se toma el agua en tubos de ensayo estériles, sosteniéndolos con la mano á ser posible ó sumergiéndolos, después de atarlos con un bramante, ó bien se emplean aparatos especiales, que sirven asimismo para la toma del agua en las capas profundas (por ejemplo, el matraz de Esmarch, cuyo cierre perfecto, está asegurado mediante un peso de plomo sostenido por un anillo de goma y que puede ser levantado bajo el agua á distintas profundidades ó también el *tubo doblado* según *Sclavo*: Un tubo de ensayo estirado á la lámpara por su extremo abierto, hasta obtener un tubito delgado, que se encorva y cierra al soplete y que después de sumergido hasta la profundidad que se desee, se abre, dejando caer un peso sostenido por un bramante,

adjunto al tubo y que lo rompe por la parte estirada, llenándose de agua.)

Modo de conservar las muestras hasta efectuar su análisis: Si no puede efectuarse el análisis del agua inmediatamente, que es lo mejor, guárdanse las muestras rodeándolas de hielo.

Disposición de las muestras para el análisis: Si se quieren conocer únicamente las especies bacterianas contenidas en un agua, se toma una cantidad conveniente de ésta, inmediatamente después de agitarla (según la probable riqueza en gérmenes, se toma de 1 öse á 1 c. c.) se echa en gelatina licuada, se mezcla bien y se vierte en placas.—Si se trata de investigar el *número* de *gérmenes* de un agua, se procede del modo siguiente: Mediante una pipeta estéril se pone desde una gota de agua (ó sea 0,05 c. c.) hasta un c. c., en una placa de Petri pequeña, vacía y estéril. (De cada muestra de agua, se hacen siempre por lo menos dos siembras y en cantidades distintas.) Las aguas muy ricas en gérmenes (procedentes de pozos, ríos, pantanos, etc.;) se diluyen antes de sembrarlas, cada c. c., en 10-100 veces su volumen con agua estéril (por tanto con 9-99 c. c.) y de las diluciones, se siembra de 0,1-1 c. c. (igual, según la dilución, á una décima hasta una centésima del agua analizada.) Al agua colocada en la placa, se le añaden 10 c. c. de gelatina estéril licuada y caliente á unos 30-40°, procedente de un tubo, cuya boca se ha flameado previamente, se mezclan perfectamente el agua y la gelatina, dando con cuidado á la placa un movimiento de vaiven, y se deja solidificar el contenido, colocándolo sobre un plano perfectamente horizontal y luego se pone en la estufa á 20-22°, durante 48 horas. (Fórmula de la gelatina recomendada oficialmente para el análisis de aguas, v. pág. 18.) Luego se cuentan las colonias: Se coloca la pequeña placa so-

bre una lámina de vidrio negro, dividido en cm.^2 y en $\frac{1}{9}$ de cm.^2 . (La placa del aparato de Wolfhügel) en caso de haber pocas colonias, se cuentan con una lente todas las de la placa y se calculan las contenidas en 1 c. c. de agua, procedentes del desarrollo de los gérmenes existentes en la gelatina, á las 48 horas. Cuando la placa se cubre de numerosas colonias, se cuentan las existentes por lo menos en 10 cm.^2 (ó si no pueden contarse las de éstos, en $20 \frac{1}{9}$ de cm.^2), de los números obtenidos se deduce el término medio de colonias, correspondientes respectivamente á 1 cm.^2 ó á $\frac{1}{9}$ de cm.^2 y se calcula, multiplicando por el número de cm.^2 ó de $\frac{1}{9} \text{ cm.}^2$ de superficie. (La superficie de la placa = $r^2 \pi$, r espresado en cm.), el número de colonias, procedentes de la cantidad de agua sembrada y en caso de haber sembrado menos de 1 c. c., se calcula de nuevo el número de gérmenes contenidos en 1 c. c.—En lugar de contar en cuadrados, puédese contar también en sectores. Se coloca la placa sobre papel de filtro, se sigue con lápiz su contorno y se divide el círculo resultante, en un número de sectores de igual tamaño, en algunos de los cuales se cuentan las colonias y por los números resultantes, se calculan las contenidas en la placa y las de 1 c. c. de agua. Los resultados son en este caso algo más exactos que empleando los cuadrados. (Las placas tienen siempre el fondo algo abombado. Por tanto, la capa de gelatina, es más delgada en el centro que en los bordes, siendo menor el número de colonias en aquél, que en éstos. Contando por sectores, se atiende tanto á los puntos cubiertos de capa delgada, como á los de capa gruesa, mientras que contando por cuadros no sucede así.)—Cuando las placas están muy germinadas, se cuentan las colonias en el microscopio, con poco aumento. Mediante el micrómetro objetivo se calcula el tamaño del campo de visión empleando una combi-

nación de lentes y una longitud de tubo, determinadas. Luego, se cuentan las colonias por lo menos en 10 campos, se deduce el término medio y se multiplica por el factor que da el número de veces, que es mayor la placa que el campo de visión. Luego se sabe cuantas colonias hay en la placa ó sean las procedentes del agua sembrada y se calcula por ellas el número de gérmenes contenidos en cada c. c. de agua.

Si las diferentes siembras de una misma muestra, dán números distintos, se considera el mayor de todos ellos, como el más exacto.

Si se carece de placas para disponer los cultivos se vierten las cantidades de agua destinadas á siembras en tubos que contengan gelatina licuada y se disponen en tubos rodados (v. pág. 32) se tienen éstos en la estufa como las placas y se cuenta á las 48 horas, con aparatos especiales.

Si se mezclan el agua y la gelatina en los tubos, y luego se vierten en placas, deben contarse además de las colonias de la placa, las desarrolladas en el residuo de gelatina que queda en el tubo, puesto también en la estufa.

Al dato del contenido en gérmenes, de un agua, debe acompañar siempre una nota, en la que se consigne, el tiempo que se tardó en verificar el recuento de colonias (muchos gérmenes se desarrollan y no forman colonias visibles en la gelatina hasta los 3-4 días ó más,) la temperatura á que se efectuó el crecimiento y que reacción (cantidad de álcali, excedente del punto neutro para el tornasol) y eventualmente también, que composición tenía la gelatina. Para que los análisis sean comparables, se debe emplear la gelatina de la pág. 18, y las siembras han de germinar á 20-22° y durante 48 horas.

Hesse y Niedner recomiendan, (Zschr. f. Hyg.

T. 29) para el análisis de aguas, un substrato á base de agar, compuesto de 100 de agua común, 1,25-2 de agar y 0,51 de alimento de Heyden, preparado según las indicaciones de la pág. 86 *a*. No es necesario neutralizar. Las placas preparadas con este medio de cultivo, al contrario de lo que sucede siempre por lo regular, en la gelatina ordinaria, permiten, á causa de no ser licuadas, observaciones más largas que las placas de gelatina. Sin embargo, en este medio de cultivo, se desarrollan mal las bacterias fecales.

Para la investigación ulterior de los organismos desarrollados, se preparan cultivos puros de todas las colonias diferentes observadas, ó sólo de las conocidas que ofrezcan interés especial.

Para la investigación del b. tífico y del vibrión cólerico en el agua, v. pág. 120 y 127 número 4, final.

Análisis del aire

1. Para la investigación aproximada de las especies bacterianas contenidas en el aire, se exponen al aire durante un tiempo más ó menos largo, placas de agar ó de la gelatina abiertas, ó bien fragmentos de patata preparados según el método 1, pág. 25.

2. Para recoger cuantitativamente, los gérmenes de grandes cantidades de aire, se acepta el método de Petri. Mediante una bomba aspirante, unida á un contador, se hace pasar una determinada cantidad de aire, al través de dos pequeños filtros de arena, que se encuentran en el interior de un mismo tubo de vidrio, separados entre sí por fragmentos de tela metálica ó de gasa que se han esterilizado previamente y provistos así mismo en la parte externa de otros fragmentos me-

tálicos ó de gasa también estériles. La arena y la gasa se siembran en placas de gelatina ó de agar. Si el filtro era muy compacto, la primera porción del mismo contendrá ya todos los gérmenes. En lugar de la arena, puede emplearse también azúcar en polvo, que se disuelve en la gelatina después de sembrado (sin embargo es muy difícil de esterilizar!) También dá buenos resultados el empleo, como material para el filtro, de fragmentos de vidrio fundido en granos de 0,25-0,5 mm. de diámetro, sobre todo si se emplean además tubos construídos especialmente para ello (v. Ticker Zschr. f. Hyg. Tomo 23.)

3. El siguiente método (*Bujwid*) es sencillo: Se hace pasar una corriente lenta de aire, al través de tres tubos de ensayos, que contengan 2 c. c. de agua estéril cada uno, y provistos de tapones de goma con tubos doblados, en la misma disposición que un frasco lavador y unidos unos á otros. El aire deja los gérmenes en el agua. Una vez terminada la absorción, se siembran cantidades conocidas de aquella en gelatina que se dispone en placas—v. pág. 159.

Mediante una esponjita humedecida en caldo, se recoge polvo del que se deposita procedente del aire. Se exprime aquella en gelatina ó agar líquidos, que se vierten luego en placas. Si se quiere investigar el b. tuberculoso, se exprime la esponja en caldo y se inyecta éste en el peritoneo de un cobaya.

Análisis del suelo

Se llena una cuchara de platino, cuya cabida se conoce, con la muestra de tierra que se ha de analizar, y se siembra ésta en placas ó en tubos rodados. Hay en

el suelo muchos bacilos anaerobios; en caso necesario se disponen cultivos especiales para éstos. O bien, se agita fuertemente una cantidad determinada de tierra, con solución de sal común y se siembra una porción conocida de esta solución, en gelatina, etc., (no es exactamente cuantitativo, pues aunque se agite fuertemente, no se separan todos los gérmenes contenidos en los granitos de tierra.)

Para el análisis de las capas profundas del suelo se cava un hoyo, de cuyas paredes se raspan porciones de tierra, que se siembran, ó se emplea el perforador de Fränkel. Este se introduce en el suelo en una dirección determinada, y dándole movimiento de rotación; cuando alcanza ya la profundidad deseada, se le dan vueltas en sentido contrario, con lo cual se abre una pieza situada en la parte inferior y se llena de tierra una cámara que se encuentra al lado de la punta. Luego se extrae el aparato de la tierra, dándole vueltas en la primitiva dirección. Las siembras se hacen como ya se dijo.

Para investigar en las muestras de tierra la presencia de microorganismos infecciosos (tétanos, edema maligno, carbunco) se ensayan subcutáneamente sobre animales: ó el material directamente ó solución de NaCl al 0,8 % previamente agitada con aquél.

IX

Inoculaciones y autopsias

Inoculaciones

Si en el sitio escogido para la inoculación, hay pelos ó plumas que estorban, se cortan ó rasuran. La piel se limpia con jabón, luego con alcohol y después con sublimado, por último puede limpiarse con agua estéril.

1. *Inoculación cutánea:* Se hace un ligero rasguño en la piel del animal y mediante una öse de platino, se pone material inoculable en la herida. O bien, se afeita una porción de la piel y se frota fuertemente, por encima, con el material infectado.

Inoculación subcutánea:

a) *En una cavidad de la piel.* Se levanta mediante unas pinzas, un pliegue de piel, se corta en él una pequeña abertura, con unas tijeras estériles y se perfora el tejido subepidérmico con la aguja de una lanceta ó con la punta de una tijera, estériles, formando una pequeña bolsa. En esta, se coloca el material infectado por medio de una öse de platino.

El sitio escojido para hacer la inoculación en las ratas y ratones, es principalmente el contorno superior de la base de la cola; los animales se cogen por la nuca con unas pinzas largas y se les sujeta la cola con la mano. En los cobayas se escoge con preferencia, para hacer la inoculación, el vientre ó el pecho, en los conejos la cara interna de la oreja, en la que se produce un ancho rasguño y se escava un poco con la aguja de la lanceta. En las aves se inocula preferentemente en los músculos del pecho.

b) Con la jeringa. Se emplean distintas clases de jeringas para la inyección subcutánea; las de Pravaz (modificación con el émbolo de asbesto cambiabile-) Koch, Stroschein, Loeffler (con émbolo de goma, que puede hacerse uno mismo, con facilidad) son las mejores; las jeringas deben esterilizarse antes de usarlas, en corriente de vapor ó con alcohol-éter. Es innecesario desinfectar previamente el sitio de la inyección. Estas se hacen en los mismos sitios citados en *a*). (Los conejos en el bajo vientre).

3. *Inoculación intraperitoneal.* Se hace una sección en la parte abdominal. Se introduce profundamente una cánula roma en el tejido muscular del peritoneo y se inyecta.

4. *Inoculaciones, intramuscular, intrapleurales, etcétera,* análogas á las precedentes.

5. *Para inocular en la cámara anterior del ojo.* Se separa la córnea, cocainizada, por la parte superior junto al borde escleral (como se hace en la iridectomía) y se incluye el material infectado. El ojo ha de permanecer después, vendado durante algún tiempo. Se emplea especialmente para inocular el b. tuberculoso. También puede hacerse la inyección con una jeringa. *Inoculación en la córnea cocainizada* (por ejemplo, con vacuna) por una estría lisa y tangencial, para lo

cual se coge con una pinza un pliegue de la conjuntiva, para sujetar el ojo.

6. *Inyección en los conductos sanguíneos.* Se pone al descubierto una vena escogida, fácilmente asequible (p. ej. la yugular externa), se introduce en ella una cánula de punta fina y se practica inyección centrípeta. Debe cuidarse mucho de no introducir aire con la inyección (muerte por embolia debida al aire).—En los conejos, se escoge generalmente una vena de la oreja, para la inyección. Se secciona la piel de la cara externa de la oreja, paralelamente á la vena y luego se levanta aquella, de modo que la vena quede al descubierto. Se comprime la base de la oreja, con lo cual se hincha la vena, y se introduce la cánula. Si el tejido que rodea el punto inyectado se entumece, no debe dejarse la punta de la cánula en la vena.

7. Para hacer inyecciones en el estómago, se coloca un palo de madera entre los dientes incisivos del animal y por el espacio intermedio se introduce hasta el estómago del mismo, una sonda flexible. Por medio de esta, se inyectan en el estómago del animal los materiales infectados, etc. En los animales grandes, se les introduce tanto como sea posible, hacia el interior de la garganta, de modo que deban tragarlos, fragmentos de patata, en los que se hace un hueco, que se llena con el material inoculable y cerrados luego, mediante otro fragmento delgado de patata (se emplean asimismo bolas de pan infectadas).

8. *Inoculación por la ingestión de alimentos.* En caso de que el material que se quiere ingerir no constituye por sí sólo un alimento, se mezcla bien con uno de estos (p. ej. se pueden extender los cultivos sobre pedazos de pan ó se empapan estos, etc).

9. *Inoculación por las vías respiratorias.* Inhalación de los gérmenes pulverizados ó esparramados en

aparatos de inhalación especiales que estén perfectamente cerrados. O bien inyección en la tráquea introduciendo la cánula de la jeringuilla entre dos anillos traqueales.

Dosificación del material inoculable:

Para inyectar cantidades conocidas de la substancia infectada, en el cuerpo animal, se procede del modo siguiente:

1. *Substancias líquidas* (si es necesario, se diluye previamente una cantidad medida de las mismas, en una proporción determinada de caldo estéril ó de sol. al 0,8 % de Na Cl) se inyectan por medio de jeringas calibradas, en la cantidad deseada.

2. *Substancias inoculables no líquidas*. Para tomar el material inoculable, se utiliza una öse de platino hecha en el extremo de un alambre delgado de platino, y el extremo opuesto se puede fijar en una varilla, mediante una pieza que pueda atornillarse (análogo á los lapiceros de bolsillo). El alambre se coloca sobre un fragmento de corcho y se pesa el conjunto exactamente, luego se carga con material inoculable y se pesa de nuevo. La diferencia entre ambas pesadas, nos dá el peso del material inoculable. Luego se sumerge la öse, en un tubo que contenga un líquido estéril, en proporción tal, que una cantidad determinada y fácilmente medible del mismo (p. ej. 0,5 c. c.) contenga el material inyectable en proporción también determinada (p. ej. 0,2 mg.), mezclándolo bien por frotamiento y agitación y luego se inyecta. Empleando la misma öse, el mismo material inoculable y cargando la öse siempre igual, aproximadamente se obtienen valores tan iguales ó aproximados, que puede prescindirse de las pesadas. Se preparan öses que cargadas bien con-

tengan unos 2 mg. de raspado de cultivos de *v. tífico* ó de *v. colérico*, de 24 horas y sobre agar (las llamadas öses normales), se adoptan las varillas—medida de Czaplenski: para preparar öses iguales.

Determinación del número de bacterias en el material inoculable. Se toma el material como ya se dijo y se siembra una cantidad del mismo, idéntica á la que se inyectó, en agar ó gelatina y se disponen placas. En caso necesario, se diluye previamente, otra vez, en una cantidad determinada de caldo estéril y se siembra una parte alícuota de la dilución). Después de desarrolladas las colonias, se cuentan como las del agua (página 160). Del mismo modo se determina el número de bacterias de cualquier clase de material.

Rotulación y conservación de los animales de ensayo.—Las ratas y ratones se colocan en altos vasos de vidrio (las conservas usadas para poner dulces p. ej.) convenientemente rotulados y provistos de un cierre de tela metálica. Los cobayas se colocan en piedras ollares, con tapadera de alambre y se clasifican según su peso, sexo y color. (Se tienen clichés especiales con retratos de los animales para inscribir el color). A los conejos, se les tiñen las orejas con diferentes colores de anilina, para distinguirlos ó bien se les clavan en las orejas unas chapitas metálicas numeradas, cosa también aplicable para distinguir los cobayas. Los animales infectados, se colocan en jaulas especiales y á ser posible, aislados cada uno por sí.

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

La inmunización de animales, por medio de inyecciones en dosis progresivas, de toxinas bacterianas, de bacterias muertas ó vivas, es variable según la especie bacteriana y según el fin que se persigue. En general, se procede de modo que la primera inyección subcutánea, intraperitoneal, etc., se efectúa con una cantidad de cultivo ó de toxina, cuyos efectos son inferiores á la dosis letal mínima. Se observan exactamente las variaciones en el estado del animal y la segunda inyección se efectúa con una cantidad algo mayor de cultivo ó de toxina, en caso de que aquél esté restablecido completamente, y en especial además, en caso de que haya aumentado de peso ó por lo menos no haya perdido. En iguales circunstancias se efectúan las inyecciones siguientes.—La inmunización, para obtener suero destinado á la reacción de Widal, se hace inyectando cultivos de tifus, cólera, etc., muertos por calefacción á 60°, durante 1 hora. En los conejos, bastan generalmente ya 3-5 inyecciones, aplicadas intravenosamente, en períodos de 7 días y aumentando desde 1 á 10 öse de cultivo sobre agar, muerto. A los 7 días de la última inyección, se efectúa la sangría en una vena de la oreja, en la yugular ó en la carótida; se descubre la vena asépticamente, se hacen dos ligaduras flojas distantes, se abre el espacio intermedio por sección longitudinal y se aprietan las ligaduras cuando la sangría es suficiente (la sangre se recoge en vasijas estériles.) En los animales grandes, sin sajarles la piel se comprime la yugular hacia la columna vertebral y se le introduce el trócar ó la jeringuilla lejos de aquélla. Sangrías en las palomas v. pág. 99, 8. La sangre se guarda 24-48 horas en la nevera, luego se separa el suero estéril, por medio de una pipeta (se centrifuga si es necesario.)

Autopsia

La autopsia debe hacerse tan pronto como sea posible después de muerto el animal. Si conviene aplazarla, se coloca el cadáver en un sitio fresco, para conservarlo.

El animal destinado á la autopsia debe tocarse con las manos lo menos posible, antes de ejecutarse aquélla y no debe tocarse nunca durante la misma (á excepción de los animales grandes), sinó con los instrumentos. Los destinados á efectuar la autopsia se preparan de antemano. Luego se tiende el animal con el vientre hacia arriba y las extremidades extendidos á los lados del tronco. Las patas, los pies, ó las alas se fijan sobre la tabla de disección, por medio de alfileres, clavos ó punzones ó también con lazadas de hilo, atadas luego á unos ganchos que se atornillan en la tabla. Después se humedece convenientemente la piel del vientre y la del pecho, con solución de sublimado, para evitar que se desparramen los pelos al disecar aquella ó bien con xilol para matar los parásitos que pueda haber, ó se jabona la piel y se afeitan los pelos; también es conveniente quemar los pelos antes de humedecerlos. A las aves se les despluma el pecho y el vientre y luego se humedece la piel. Luego se corta la piel desde el cuello hasta la sínfisis pubiana, con instrumentos esterilizados (v. pág. 9 y 10 números 1, 2, 3), en la línea media y se levanta en ambos lados, separándola hasta la cara interna de la pierna. Se flamean los músculos puestos al descubierto, para destruir los pelos que hayan caído encima. Se levanta mediante instrumentos recientemente esterilizados un pliegue de la pared muscular del abdomen, por debajo del apéndice xifoídes, se raja dicha pared muscular, mediante un bisturí

inclinado hacia arriba, en la línea media ó mejor aún hacia el lado derecho del cuerpo, se separa la parte adherida al arco de las costillas y se arrancan las porciones musculares cada cual hacia el lado correspondiente, para lo cual, conviene fijarlas con alfileres, sobre las porciones de piel extendidos á ambos lados. La porción muscular separada hacia el lado izquierdo, resulta por tanto, mayor que la del derecho, con lo cual el bazo, órgano importante en la mayor parte de las enfermedades infecciosas, puede extraerse luego cómodamente, evitando además el que pueda contaminarse por su contacto con la piel. En las ratas y ratones se desgarran la pared muscular del abdomen con dos pinzas, en lugar de dejarla. Después de inspeccionar los órganos de la cavidad abdominal y de haber preparado con ellos, los cultivos que se deseen, se abre la cavidad torácica, practicando cortes, con unas tijeras estériles, á ambos lados del esternón y próximos al arranque de las costillas, luego se levanta el apéndice xifoideo y se le junta, levantándolo también, el esternón, junto con los fragmentos de costillas adheridos, después de separarlo del diafragma de modo que queden al descubierto los órganos torácicos.

Se flamean cuidadosamente cada vez los instrumentos ó se cambian tan pronto se crea que quizá han estado en contacto de algo que no se desee. *Nunca deben dejarse los instrumentos sin antes flamearlos bien.*

Los órganos con los cuales quieren prepararse cultivos (véase además pág. 51) se sajan con la punta de un instrumento estéril; con una òse de platino se explora el interior del órgano, introduciéndola por el corte y se siembran después rápidamente, partículas orgánicas que quedan adheridas á la aguja. Se supone que la superficie de los órganos ha sido contaminada, se desinfecta pasándoles por encima

previamente, la hoja de un cuchillo calentada y luego se procede como se ha dicho. Si se quieren sembrar fragmentos más grandes, se cortan éstos con tijeras estériles y se cogen con una öse de platino todavía caliente, á la cual se adhieren fácilmente. Los nódulos duros (p. ej. de órganos tuberculosos) se separan cortándolos con tijeras estériles, se aplastan entre dos porta-objetos estériles (pág. 9 número 1) y se pasan los fragmentos á los medios de cultivo y á los cubre-objetos.

Si las siembras han de efectuarse más tarde, se guardan los pedazos de órganos estériles en dobles placas, estériles también (cada órgano separadamente.)

Los órganos que contienen siempre bacterias, como el intestino, p. ej., deben abrirse los últimos, después que se ha cuidado de hacer las siembras con los demás órganos.

Al hacer la autopsia, debe observarse en que estado se halla el punto donde se hizo la inoculación.

Para disponer preparaciones microscópicas, se arranca un fragmento de tejido con una pinza y se frota sobre un cubreobjetos tiñéndolo luego (v. pág. 51 y siguientes).

Conservación de fragmentos de tejidos para la observación en cortes (v. pág. 55 y 58).

Una vez terminado el análisis del cadáver, se quema éste en un horno (ó caldera) ó se envuelve en papel pergamino y se entierra, ó bien se cuece durante 1-4 horas en corriente de vapor, del mismo modo que los gérmenes infecciosos y se entrega luego al desollador; la mesa de disección, se lava con sublimado al 1-2⁰/₀₀ + 3⁰/₀ de ClH; los punzones, etc., se flamean.

X

Métodos de conservación de preparaciones, cultivos y órganos animales

A. Preparaciones

Las gotas suspendidas pueden conservarse largo tiempo, no obstante, puede efectuarse en ellas eventualmente un ulterior desarrollo de microorganismos y degeneración de los mismos. Si se quiere conservar un estadio determinado del desarrollo, se levanta el cubre-objetos y se pone una gotita de formalina en la misma gota suspendida, ó en un ángulo del cubre-objetos ó bien un indicio de solución de ácido ósmico al 2% y se coloca el cubre de nuevo en su sitio.

Conservación de preparaciones teñidas (véase página 54 y 59).

Los mohos y levaduras se guardan sin teñir, preferentemente en gelatina *glicerinada* (7 de glicerina, 6 agua, 1 gelatina, 1 de ácido fénico al 1%, calentar el conjunto y filtrar). Se recubren los bordes con lacre ó barniz.

B. Cultivos

Para la resiembra de cultivos y conservación del material bacteriano vivo, v. pág. 30 y sigs.

Si se quieren guardar cultivos en un determinado y característico estadio de su desarrollo (p. ej. los cultivos por picadura, en gelatina, de vibrión colérico, con las típicas «burbujas de aire» en la superficie) para ponerlos de manifiesto en las demostraciones, deben matarse primero aquellas por los vapores de aldehído fórmico.

En los cultivos en tubos, se ponen algunas gotas de formalina en la parte inferior del tapón de guata y se coloca éste de nuevo en su sitio, recubriendo la boca del tubo con un capuchón de goma y dejándolo así, por lo menos 24 horas. (Si es un cultivo en gelatina y está ésta licuada, se deja hasta que la gelatina se haya cuajado de nuevo por la acción del formol). Luego se procede de distintos modos, á saber:

1. Se puede guardar el tubo tal como está. Condición precisa: el capuchón de goma ha de cerrar herméticamente, de lo contrario el cultivo se secaría poco á poco.

2. Se levanta el capuchón de goma y se empuja un poco el tapón de guata hacia el interior del tubo, se vierte encima de éste una capa delgada de parafina fundida y se deja solidificar esta última. Si aparece alguna grieta, se rellena con parafina.

3. Se quita el capuchón de goma y se coloca en la boca del tubo, un cubreobjetos redondo que ajuste exactamente y se recubre, mediante un pincel, la boca del tubo y el cubreobjetos con gelatina glicerizada (véase página 174 A), (en lugar de ácido fénico puede añadirse sublimado al 1 0/0) se deja secar y recubre luego con barniz ó lacre.

4. Se calienta sobre la llama de un mechero Bunsen, una aleación metálica fácilmente fusible (Metal de Rose, metal fusible) y se hacen caer gotas de una altura de $\frac{1}{4}$ — $\frac{1}{2}$ m. sobre una lámina de vidrio. La masa

metálica discoidea y delgada que se obtiene, se coloca, después de separar el capuchón de goma, sobre la boca del tubo de cultivo y se comprimen fuertemente los bordes que sobresalen, sobre las paredes del tubo y luego se calientan sobre la llama del mechero Busen, dando vueltas al tubo lentamente, hasta conseguir un cierre hermético.

5. Se separan el capuchón de goma y el tapón de guata y se funde el tubo al soplete, por debajo de la boca. Debe tenerse cuidado en no dañar al medio de cultivo, al calentar el vidrio.

N. B. Los tubos que contienen agua de condensación, se guardan siempre en posición inclinada; ó bien, se vierte con cuidado el agua antes de tratarlos por la formalina.

Los cultivos en placas se pueden conservar de la siguiente manera:

1. Se ponen un par de gotas de formalina en la tapa y se deja actuar 24 horas. (A ser posible, se invierte la posición de la placa, para evitar que caigan gotas de formalina sobre el medio de cultivo; sino, se pega con cera un pedazo de papel de filtro en la parte interna de la cubierta y se humedece aquél con formalina). Luego se quita esta última (en caso de que no se haya evaporado ya) y se cubre el borde de la placa con una faja de goma.

2. Se hacen cultivos en placas, cuyas piezas ajusten perfectamente una en otra, se hace el tratamiento por la formalina como en el núm. 1 y se cierra herméticamente con parafina el anillo de contacto de ambas piezas.

3. Se hacen los cultivos en matraces planos, análogos á tubos de ensayos aplastados, etc., se procede como en los tubos, (v. más arriba).

Los *fragmentos de placas de agar ó de gelatina* pueden conservarse del modo siguiente:

1. Se tratan por el formaldehído, de modo análogo al antes citado. Se corta y separa la porción que desea conservarse, se pasa á un portaobjetos (eventualmente se deseca sobre ácido sulfúrico, hasta que quede reducido á una capa delgada), se cubre con glicerina y un cubreobjetos y el borde de este último se recubre con laca-asfalto. El aspecto de las colonias se deforma algo. Sólo dá buenos resultados con las placas de agar.

2. Se dispone la placa sobre una laminilla de vidrio y una vez efectuado el desarrollo, se pone en desecador sobre H_2SO_4 , se tiñen como las preparaciones en seco y se conservan en bálsamo del Canadá (no son apropiados para observar las colonias mismas, sinó para estudiar la distribución de las bacterias en las colonias).

C. Órganos animales destinados á demostraciones

1. Se inmergen los órganos, hasta decoloración completa, en la solución siguiente: agua común 4000, formalina 800, acetato potásico 85, nitrato potásico 45.

2. Se pasan luego á alcohol de 80 %, hasta que reaparezca el color natural.

3. Se guardan definitivamente en la siguiente solución: Agua dest. 900, glicerina 300, acetato potásico 200 (fórmula de Stassmann).

ÍNDICE ALFABÉTICO

	Pgs.		Pgs.
Abbé , aparato de iluminación, su colocación.	5	Agua de carne.	13
Acidos, producción de los mis- mos por las bacterias.. . . .	45	» » diluida.	18
Acido ósmico (fijación por el).	52	» de peptona.	22
» pirogálico.	40	» concentrada.	22
» sulfhidrico, su produc- ción por las bacterias.	47	Albuminato alcalino - agar (Deycke).	95
Actinomicés.	140	Alcalinización de los medios de cultivo.	19
Aftas.	142	Alcalis, ensayo acerca de su formación por las bacterias.	45
Agar, como medio de cultivo.	17	Amibas..	145
» con sangre (en la su- perficie)..	99, 138	Anaerobios, (cultivos de).	38
Agar, con sangre (mezcla- do).	100, 149	Análisis del agua.	158
Agar, en placas.. . . .	32	» del aire.	162
» glicerinado.. . . .	20	» de las heces ícales.. . . .	112
Agar-suero.	24	» de las roseolas.	111
» ventajas é inconve- nientes.	33	» del polvo atmosfé- rico.	162
Agar verde de Loeffler.. . . .	115	Análisis del suelo.. . . .	163
Aglutinación en el cólera.. . . .	128	Aparato de cultivo de Botkin.	42
» en el muermo.	92	» » de Blü- cher (anaerobios).	42
» en el tifus.	108	Ascítico, líquido.	24
» en la disente- ría.	121, 122	Assmann (coloración de).	66
Aglutinación en la meningitis.	136	Autopsias..	171
Agua (análisis del).	158	Azul de metileno de Loeffler.	62
		» » fenicado de Kühne.	63

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Azul de metileno, su reducción.	46	Cólera, (vibriones del).	123
Bacilo anthracis , (carbunco).	81	» » su aislamiento en el agua.	27
» » , (filamentos esporalados de).	82	Colibacilo.	122
Bacilo coli	122	Colonias, (siembras de).	33
» de Koch-Weeck.	100	» » por picadura.	33
» de la disentería.	120	Coloración de cápsulas.	72
» de la influenza.	99	» de cirros.	75
» de la Lepra.	91	» de cortes, generalidades.	63
» de la peste bubónica.	131	Coloración de cubreobjetos, generalidades.	51
» de la pneumonia.	135	Coloración de esporas.	73
» de la tuberculosis.	83	» de los bacilos de la tuberculosis, lepra, etc., (v. éstos.)	
» del chancro blando.	93	Coloración por contraste.	65
» del esmegma.	90	» según Claudius.	70
» del muermo.	91	» » Giemsa.	148
» del tétanos.	132	» » Gram-Günter.	68
» diftérico.	94	Coloración según Gram-Nicolle.	68
» tífico.	101	Coloración según Gram.	66
Bacilos paratíficos	101	» » Kühne-Pregl.	64
» piocianeos.	133	Coloración según Loeffler.	63, 75
» pseudo diftéricos.	94	» » Manson.	147
Bacteriolisis (Pfeiffer).	104	» » May-Grünwald.	66
Bilis de buey , (medios de cultivo con).	112	Coloración según Nicolle (con tanino).	64
Blücher , (aparato de cultivo de).	42	Coloración según Nicolle (con Thionina.	65
Botkin , (aparato de cultivo de).	42	Coloración según R. Pfeiffer.	64
Bunge , coloración de cirros.	77	» » Ribbert.	72
Cafeína , (medios con).	114	» » Romanowski.	148
Caldo de cultivo	14	Coloración según Weigert.	70, 141
Calefacción , (resistencia de las bacterias para la).	48	Congelación en esencia de anís.	57
Cápsulas dobles . (Petri).	31	Conservación de cultivos, (métodos de).	174
» (métodos de coloración de).	72	Conservación de preparaciones.	53, 174
Carbunco , (bacilo del).	81		
Celoidina , (inclusiones en).	56		
Cirros , (método de coloración de).	75		
Claudius , (coloración según).	70		
Cólera , (diagnóstico del).	124		
» (reacción roja del).	124		

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Corpúsculos de Negri.	151	Disentería, (bacilo de la).	120
» polares.	96	Dosificación del material inoculable.	168
Cortes de tejidos, su coloración.	63	Drigalski-Conradi, (medios de cultivo de).	113
Cortes de tejidos, su preparación.	55	E ndo, (medios de cultivo de)..	114
Cromatina, (coloración de la).	148	Endurecimiento de los fragmentos de tejidos.	55
Cromoproteidos, ensayo acerca de su formación.. . . .	47	Ensayo de Pfeiffer (cólera).	130
Cubreobjetos, modo de limpiarlos.	7	Ensayos en animales (prescripciones para conservarlos).	
Cubreobjetos, preparaciones coloración..	53	Ensayos (autopsia).	171
Cubreobjetos, preparaciones conservación..	53	» inmunización, (v. tifus, etc.).	
Cubreobjetos, (preparaciones en).	51	Ensayos inoculaciones.	165
Cubreobjetos, preparaciones fijación.	52	» sangrias.	155
Cultivos de anaerobios.. . . .	38	Esmegma, (bacilo del).	90
» en el cuerpo animal.	37	Espiroquetas de la fiebre recurrente..	151
» en estria y por picadura.	35	Espiroquetas de la sífilis.	149
Cultivos en gota suspendida	38	Esporas, ensayo acerca de su formación.	48
» en placas..	30	Esporas en filamentos, su obtención en el carbunco.	82
» puros, su preparación.	37	Esporas, (coloración de).	73
Cultivos (resiembra de).	34	Espustos, modo de recogerlos.	156
» su preparación.	34	» análisis del b. tuberculoso, influencia, etc., (v. éstos).	
Czaplewski, (fuchina glicerinada de)..	63	Estafilococos..	134
D esecación, (resistencia de las bacterias para la)..	48	Esterilización á la llama.	9
Desinfección (con vapor).	9	» al calor seco.	10
» de cultivos.	10	» de los medios de cultivo, (v. éstos).	
» de las manos.	12	Esterilización en autoclave.	9
» de los cadáveres..	173	» fraccionada.	11
Desinfección del sitio de la inoculación.	165	» por el alcohol y éter.	11
Desinfectantes (medios).	49	Esterilización por el vapor.	10
Difteria (bacilo de la).	94	Estreptococos.	134
» (diagnóstico de la).	94	Estreptotrix-Actinomices.. . . .	140
Digestión de las bacterias, (productos de).	169	Estria, (cultivos por).	35
		Exaltación de la virulencia.	106
		Extracto de carne, (medios de cultivo con).	18

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Exudados, su obtención.. . . .	157	Gelatina con punto de fusión elevado.	16
Falsas membranas , modo de recogerlas.	155	Gelatina de Deycke, (v. albuminato alcalino).	
Favus, (hongos del).	144	Gelatina en placas.. . . .	3
Fenoltaleina, (indicador).. . .	19	» glicerinada (para conservar)..	174
Fermentación (poder de las bacterias).	43	Gelatina glicerinada (para encolado).	56
Fibrina. (Coloración según Weigert).	70	Gelatina para análisis de aguas..	18
Ficker (tifus diagnóstico).. . .	114	Gelatina para el cólera.. . .	125
» (medios con seso).	83	» » el tifus, (v. Drigalski y Conradi, etc.). . .	113
Fiebre recurrente, (espirilo de la).	151	Gelatina, ventajas é inconvenientes.	32
Fijación con a. ósmico.	52	Gelatina verde de Loeffler. . .	115
» de frotos.	52	Giemsa, (coloración de).. . .	150
Filtración con separación de gérmenes.	11	Glicerinadas, (patatas).. . . .	83
Filtración de medios de cultivo, (v. éstos)		Gonococos..	137
Focos luminosos para el microscopio (naturales y artificiales)..	5, 6	» (secreciones pobres en).	140
Formación de ácidos.	45	Gota suspendida.	2
» de álcali.. . . .	45	» » su conservación en aparatos de cultivo. . .	4
» de a. sulfhídrico.. . . .	46	Gram, (coloración de).	66
» de cromoproteidos..	47	» modificaciones del método.	68
Formación de indol.	47	Gram, (modo de comportarse las bacterias con el).	69
» de toxinas.	50	Gram, relación de las bacterias que lo toman y no lo toman..	69
Fosforescencia producida por las bacterias.	48	Gruber, (suerorreacción de).. .	108
Fraccionada, (esterilización). .	11	Günther, (decoloración de), (en el Gram).	68
» (siembra).	36		
Friedländer, (pneumobacilo de).	135	Heces fecales , análisis.	112
Frotos, (preparaciones por). . .	51	» » modo de recogerlas..	156
Fuchina fenicada, (Ziehl-Neelsen)..	62	Heno, (medios á base de). . . .	145
Fuchina, (medios con).	114	Hesse, (medios de cultivo de). .	86
Fucus crispus, (medios con). . .	146	Heyden, (agar de)..	86
Gelatina como medio de cultivo	15	Hidrocele, (líquido de) como medio de cultivo.	24
Gelatina con mosto de cerveza.	142	Hidrofobia.	151

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Hongos.	142, 144	Manteca de cacao para inclu-	
Huevos, como medio de cul-		siones.. . . .	58
tivo.	25	Material de cultivo, su obten-	
Iluminación de las prepara-		ción.	153
ciones microscópicas. . . .	5	Materias colorantes, para	
Iluminación en campo obs-		teñir bacterias.	60
curo.	6	May-Grünewald, (coloración).	65
Inclusión de fragmentos de		Medios de cultivo ascíticos. . .	24
tejidos.	55	» » con azúcar. . . .	14
Inclusión en parafina. . . .	56	» » de Endo.	114
Inclusiones en celoidina. . . .	56	» » (esteriliza-	
Indol, su formación y análisis.	47	ción de los)..	20
Induración de fragmentos de		Medios de cultivo sin albú-	
tejidos.	55	mina.	28
Infección provocada en ani-		Medios de cultivo, su conser-	
males.. . . .	165	vación.	28
Influenza, (bacilo de la).. . .	99	Medios de cultivo, su distribu-	
Inmersión, empleo de la mis-		ción.	20
ma.. . . .	1	Medios de cultivo, (v. agar,	
Inmunización de animales,		gelatina, suero, etc.).	
(v. difteria, tifus, cólera), y	169	Medios de cultivo, verdes de	
Inoculaciones en animales,		Loeffler.	115
(métodos de).	165	Meningococos.	136
Inoculaciones (material para).	166	Métodos de cultivo, generali-	
» » su		dades.	30
dosificación.	168	Microscopio.	1
Iodo iodurada, (solución de). .	67	» (iluminación del). . . .	5
Johne, (coloración según).. . .	72	» (Inmersión en el). . . .	1
Leche, como medio de cultivo.		» modo de lim-	
» (suero), (v. suero-tor-	27	piarlo.. . . .	7
nasol).		Micrococcus catharralis	136
Lepra, (bacilo de la).. . . .	91	Mohos y otros hongos.	144
Levaduras.	142	Mosto de cerveza, (medios de	
Loeffler, azul de metileno.. . .	62	cultivo con).	142
» coloración de cirros. . . .	75	Muermo, (bacilo del).. . . .	91
» (medios verdes		Negri, (corpúsculos de).. . . .	151
según).	115	Neisser, (coloración según). . .	96
Lubarsch, inclusión en para-		Neutralización, cálculos para	
fina.. . . .	58	la misma en las solucio-	
Malaria, (parásitos de la).. . .	147	nes.. . . .	17, 19
Manita, (medios con).. . . .	121	Neutralización, para la fe-	
Mansón, (coloración de). . . .	147	nolftaleina.. . . .	19
		Neutralización, (v. agar, cal-	
		do, gelatina, etc.).	
		Neutralroth-agar.	103

	<u>Pgs.</u>		<u>Pgs.</u>
Nicolle, (coloración de)..	48	Picrocarmín, su preparación.	71
» con azul de metileno.	64	Piemia, análisis de la sangre.	134
» con thionina.. . . .	65	Piocianeo, (bacilo).	133
» modificación del		Piógenos, (microorganismos).	134
Gram..	68	Pirogálico, (ácido).	40
Nocht, (coloración de).	148	Placas, (cultivo en).	30
Número de bacterias, su de-		» su preparación.. . . .	30
terminación en el material		Placenta, (sangre de).	137
inoculable.	169	Pneumococos.	135
Número de placas.	159, 160	Pneumonía, (bacilo de la).. . .	135
O rchilla, (coloración con la,		Poder reductor de las bac-	
Weigert).	141	terias..	46
Orcina, (coloración con la). . .	142	Portaobjetos, (coloración	
Orina, modo de recogerla.. . . .	156	sobre)..	54
Ose normal.	168	Pregl, (coloración de).	64
Osmico, ácido, (para fijar). . .	52	Preparaciones de cortes.	55
Oxígeno, (ensayos acerca del		» por compre-	
mismo).	43	sión.	34
P aja, (medios á base de).	145	Preparaciones por frotos.. . . .	51
Pan como medio de cultivo. . .	27	Pseudodiftéricos, (bacilos). . .	94
Parafina, (inclusiones en).. . . .	56	Pus, modo de recogerlo.	155
» (inclusión rápi-		R abia canina.	151
da en)..	58	Reacción del nitrosoindol. . . .	47
Parásitos de la malaria.. . . .	147	» » en	
Paratíficos, (bacilos)..	101	los vibriones.	124
Patatas, como medio de cul-		Reacción de los medios de cul-	
tivo.	25	tivo, (empleando la fenolfta-	
Patatas con sal común.	27	leina.	19
» en papilla.	26	Reacción, variaciones con el	
» glicerinadas.. . . .	83	desarrollo de las bacterias.	45
Patogénesis, ensayos por ino-		Reacción, (v. caldo, etc.).	
culaciones.	165	Resistencia de las bacterias	
Peptona, (agua de).	22	para el calor	48
» » concentrada.	22	Resistencia de las bacterias	
Peptonización.	33	para la desecación.. . . .	49
Peste bubónica, (bacilos de la).	131	Resistencia de las bacterias	
Petruschy, (suero torna-		para los desinfectantes.	49
sol de).	45	Ribbert, (coloración de cáps-	
Pfeiffer, (coloración por la fu-		ulas)..	72
china)..	64	Romanowsky, (colora-	
Pfeiffer, suerorreacción.	130	ción de).	148
Picadura, en las colonias.	33	Roseolas, (análisis de las).. . .	111
Pick-Jacobsohn, (coloración		S angre, (medios de cultivo	
según).	65	con).	99, 138, 149

<u>Pgs.</u>	<u>Pgs.</u>
Sangre (parásitos de la) Ma- laria.	Suero sanguíneo de Loeffler..
147	24
Sangrias.	» » humano..
153	137
Secreción nasal faringea. . .	» » su obten- ción.
156	22
» » (modo de re- cogerla.	Suero tornasol.
156	45
Septicemia, análisis de la san- gre en la misma.	T amaño de las bacterias, su medición.
134	55
Siembras.	Temperatura, su medida en los animales de experimen- tación.. . . .
30	169
» fraccionadas.. . . .	Tétanos, (bacilo del).. . . .
36	132
Soluciones colorantes: (alca- linas, azul de metileno, fu- china anilizada, fuchina fe- nicada).	Tifus, (bacilo del)..
62	101
Soluciones colorantes feni- cadas..	» » su aisla- miento en el agua.
62	120
Soluciones colorantes, (pre- paración de las reforzadas). .	Tifus-diagnóstico de Ficker..
62	114
Soluciones colorantes, (pre- paración de las sencillas). .	Tochtermann, (agar suero). .
61	95
Soluciones nutritivas (según Uschinsky Fränkel).	Tornasol, (medios de cultivo con).
28	45
Soluciones nutritivas sin albú- mina.	Tos ferina, (bacilo de la). . .
28	100
Strauss, dignóstico del muer- mo.	Toxina diftérica.
92	99
Suelo, (análisis del).	Toxinas, su formación por las bacterias.
163	50
Suero inmunizante, reaccio- nes, (v. suerorreacción).	Tricofitos, hongos.. . . .
Suero inmunizante, su obten- ción, (v. difteria, tifus, có- lera).	Tripanosomas.
Suerorreacción de Gruber. . .	148
108	Tuberculosis, (bacilo de la). .
» de Pfeiffer.	83
104	Tubos rodados.
» de Widal.. . . .	32
116	V an Hermengen, coloración de cirros.
Suero sanguíneo, agar.	78
24	Virulencia de las bacterias, su exaltación.. . . .
» » agar de Tochtermann	106
95	W eigert, (coloración de). . . .
Suero sanguíneo, como medio de cultivo.	70
22	Widal, obtención de suero para la misma.
	153
	Widal, (suerorreacción de). .
	116
	Z ettnow, coloración de cirros. .
	79
	Ziehl, (solución de).
	62

Libro práctico al alcance de todos

Obra de gran éxito

LA
TUBERCULOSIS
Medios de evitarla
y curarla

POR EL

Dr. W. SCHUMBURG

Médico del Estado Mayor de Hannover

TRADUCIDA DIRECTAMENTE DEL ALEMÁN

POR

D. FRANCISCO TOUS BIAGGI

Médico del Hospital de la Santa Cruz

*Un magnífico volumen de 208 páginas
en 8.º mayor, con varios grabados y
una lámina en color. En rústica Ptas. 2'50
Encuadernado en tela inglesa. » 3'50*

OBRA NUEVA

LIBRO NOTABILÍSIMO

MANUAL
DE
Exploración Clínica
Y DE
Diagnóstico Médico

POR LOS DOCTORES

OTTO SEIFERT

Profesor de la Universidad de Würzburg

Y

FRIEDR. MÜLLER

Profesor de la Universidad de Munich

TRADUCIDO DIRECTAMENTE DE LA 11.^a EDICIÓN
ALEMANA, POR

D. Francisco Tous Biaggi

Médico de número del Hospital de la Santa Cruz de Barcelona;
Ex-Médico ayudante del mismo (por oposición)

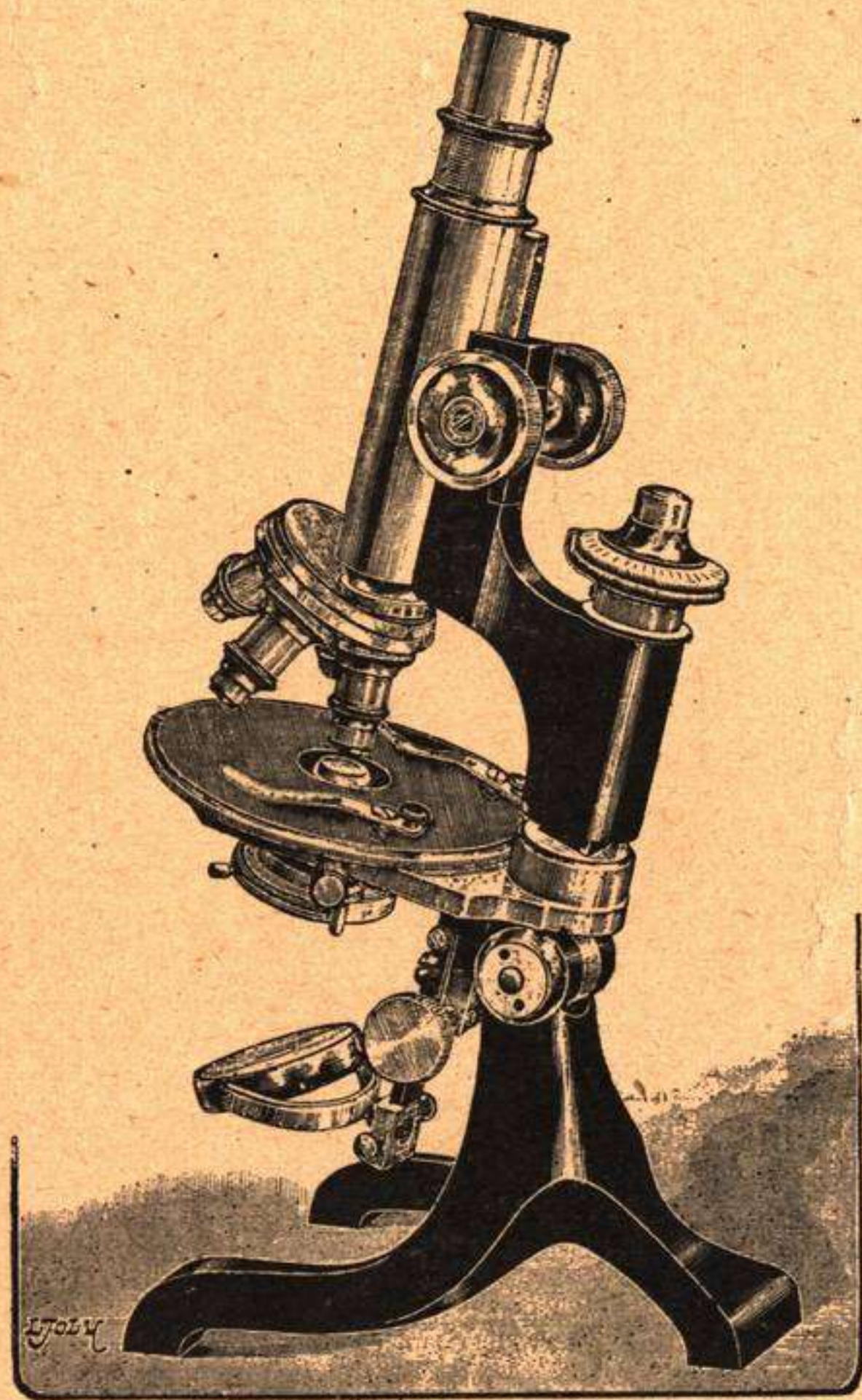
CON UN PRÓLOGO DEL

Dr. D. Eusebio Oliver

Catedrático de Patología general, por oposición, de la Facultad
de Medicina de la Universidad de Barcelona

*Un magnífico volumen tamaño 4.º, de 456
páginas con 100 grabados, muchos de
ellos en colores. En rústica Ptas. 9
Encuadernado en tela inglesa. » 10*

Modelo de Microscopio
EMPLEADO EN EL
INSTITUTO PASTEUR



INSTRUMENTOS CIENTÍFICOS
Santiago Biosca
Rambla Santa Mónica, 2. — BARCELONA
Frente al monumento **Pitarra**



01

Trabimica
Bacteriologia

018060